

VORKOMMEN VON ANTIKÖRPERN GEGEN
HÄMAGGLUTINIERENDES ENCEPHALOMYELITIS-VIRUS UND
MÄUSE-HEPATITIS-VIRUS BEI VERSCHIEDENEN SPEZIES

von
Rainer Zink
aus
Trunkelsberg

München 1985

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr
Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. P. A. Bachmann

VORKOMMEN VON ANTIKÖRPERN GEGEN HÄMAGGLUTININIERENDES
ENCEPHALOMYELITIS-VIRUS UND MÄUSE-HEPATITIS-VIRUS
BEI VERSCHIEDENEN SPEZIES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Rainer Zink
aus
Trunkelsberg

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. P.-A. Bachmann
Korreferent: Prof. Dr. H.K. Dennig

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

1. Einleitung

2. Beschreibung

2.1. Aufbau und Gliederung des Dokuments

2.2. Zielsetzung und Zwecksetzung des Projekts

2.3.1. Projektziele

2.3.2. Projektorganisation

2.3.3. Projektbudget

2.3.4. Projektzeitplan

FÜR MEINE ELTERN

2.3.5. Projektabschluss

2.3.6. Projektbewertung

2.3.7. Projektabschluss

2.3.8. Projektabschluss

2.3.9. Projektabschluss

2.3.10. Projektabschluss

2.3.11. Projektabschluss

2.3.12. Projektabschluss

2.3.13. Projektabschluss

2.3.14. Projektabschluss

2.3.15. Projektabschluss

2.3.16. Projektabschluss

2.3.17. Projektabschluss

2.3.18. Projektabschluss

3. Projektorganisation

3.1. Organisation und Verantwortlichkeiten

3.1.1. Projektleitung

3.1.2. Projektteam

3.1.3. Projektsponsoring

3.1.4. Projektschlichter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1. Aufbau und Klassifizierung der Coronaviridae	2
2.2. Antigenverwandtschaften bei den Coronaviren	15
2.2.1. Gruppe 1	16
Mäuse-Hepatitis-Virus (MHV)	17
Hämagglutinierendes Encephalomyelitis-Virus (HEV)	18
Bovines Coronavirus (BCV)	19
Humanes Coronavirus OC-43 (HCV OC-43)	21
Coronaviren der Ratten (RCV)	22
2.2.2. Gruppe 2	24
Transmissibles Gastroenteritis Virus (TGEV)	25
Felines infektiöses Peritonitis-Virus (FIPV)	26
Canines Coronavirus (CCV)	28
Humanes Coronavirus 229-E (HCV 229-E)	29
2.2.3. Gruppe 3	30
2.2.4. Geflügelcoronaviren	30
2.3. Vorkommen und Verbreitung der Coronaviren der	
Gruppe 1	32
Hämagglutinierendes Encephalomyelitis-Virus (HEV)	32
Bovines Coronavirus (BCV)	34
Humanes Coronavirus OC-43 (HCV OC-43)	35
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	37
3.1. Material und Methoden	37
3.1.1. Virusmaterial	37
3.1.2. Serumproben	37
3.1.3. Zellkulturen	39
3.1.4. Medien	40

3.1.5. Nachweis der HCV OC-43 Vermehrung durch HämadSORPTION	41
3.1.6. Virustitrierung	42
3.1.7. Neutralisationstest (NT)	42
3.1.8. Reinigung von HEV 67-N und MHV A-59	43
3.1.9. Herstellung von ImmunsereN	44
3.2. ERGEBNISSE	45
3.2.1. Seroepidemiologische Untersuchung	45
Vorkommen von Antikörpern gegen HEV 67-N	45
Vorkommen von Antikörpern gegen MHV A-59	46
Vergleich zwischen Vorkommen von Antikörpern gegen HEV 67-N und MHV A-59 bei verschiedenen Spezies	52
3.2.2. Versuche zur Züchtung des humanen Corona- virusstammes OC-43 in Zellkulturen	55
3.2.3. Neutralisationstest mit ImmunsereN	55
4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	62
6. LITERATURVERZEICHNIS	64

1. Einleitung

Coronaviren kommen bei einer großen Anzahl verschiedener Spezies einschließlich des Menschen vor. Sie galten bisher als streng speziesspezifisch. Zwischen verschiedenen Coronaviren wurden jedoch Antigenverwandtschaften festgestellt. Eine derartige Verwandtschaft existiert zwischen bovinem Coronavirus (BCV), dem menschlichen Coronavirus OC-43 (HCV OC-43), dem hämagglutinierenden Encephalomyelitis-Virus (HEV) und dem Mäuse-Hepatitis-Virus (MHV). Darüberhinaus wurden Antikörper gegen bovines Coronavirus beim Menschen gefunden und ein bovines Coronavirus von einem Säugling mit Durchfall isoliert.

Zur Abklärung der Frage, ob Coronaviren andere Spezies infizieren können und inwieweit Antikörper gegen verschiedene, antigenverwandte Coronaviren bei einzelnen Haustierspezies vorkommen, sind seroepidemiologische Untersuchungen unerlässlich. Erst wenn das Vorkommen von Antikörpern gegenüber BCV, HEV, MHV und HCV OC-43 bei verschiedenen Spezies bekannt ist, können weitere Untersuchungen über die Herkunft derartiger Antikörper erfolgen.

Im Rahmen des obigen Forschungsprojektes war es Aufgabe vorliegender Arbeit das Vorkommen von Antikörpern gegen HEV, MHV und HCV OC-43 in Seren verschiedener Spezies zu untersuchen, die zuvor schon auf das Vorkommen von Antikörpern gegen BCV getestet worden waren.

2. Schrifttum

2.1. Aufbau und Klassifizierung der Coronaviridae

Coronaviren sind pleomorphe, meist kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 60-220 nm (McIntosh, 1974; Bingham und Almeida, 1977; Pensaert und Callebaut, 1978). Die Virionen bestehen aus RNS, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden (Tyrrell et al., 1978; Robb und Bond, 1979). Sie werden als Genus Coronavirus innerhalb der Familie Coronaviridae klassifiziert. Im Saccharosegradienten liegt die Dichte der intakten Partikel bei 1,18-1,20 g/ml (Robb und Bond, 1979). Macnaughton und Davies (1980) fanden bei IBV zusätzlich inkomplette Partikel mit einer Dichte von 1,13 g/ml, denen das Ribonukleoprotein fehlt.

Coronaviren haben eine Hülle mit keulenförmigen Projektionen, die 12-24 nm lang sind und je nach Virusart eine unterschiedliche Morphologie aufweisen (Greig et al., 1971; Stair et al., 1972; Caul und Egglestone, 1977; Davies und Macnaughton, 1979). Für HEV und MHV-DIVIM wurden je zwei verschiedene Oberflächenprojektionen beschrieben (Greig et al., 1971; Sugiyama und Amano, 1981). Herkunft und Funktion der unterschiedlichen Projektionen sind noch unklar (Macnaughton et al., 1977; Macnaughton, 1981).

Einige Virusarten der Familie (z.B. HCV, HEV und BCV) weisen hämagglutinierende Eigenschaften auf.

Intakte Virionen besitzen 4-6 Strukturproteine, die als Peplomer-, Matrix- und Nukleokapsidproteine auftreten.

Einen Überblick über die Anordnung der einzelnen Bestandteile im Virion gibt Abbildung 1.

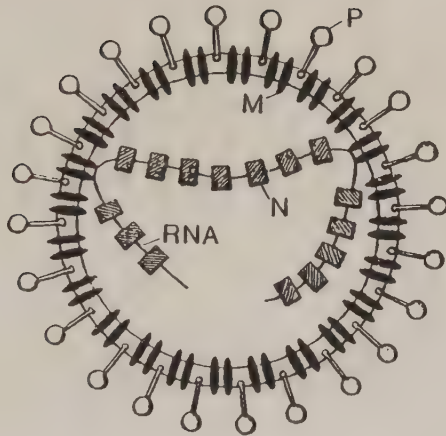


Abb. 1: Schematisches Modell von MHV A-59 (nach Sturman et al., 1980); Nukleokapsidprotein (N), Genom (RNA), Matrixprotein (M), Peplomerprotein (P).

In Tabelle 1 sind die Mitglieder der Coronaviren, ihre Kurzbezeichnungen, ihre natürlichen Wirte und die wichtigsten Krankheiten, die sie hervorrufen, sowie deren klinische Symptome beschrieben.

Tabelle 1: Genus Coronavirus

Virus	Kurzbezeichnung	Serotyp	natürlicher Wirt	klinische Symptome
Infektiöses Bronchitis Virus (Geflügel)	IBV	10	Geflügel	Respiratorische Erkrankung
Bovines Coronavirus	BCV	1	Rind	Durchfall
Canines Coronavirus	CCV	1	Hund	Durchfall
Felines Infektiöses Peritonitis Virus	FIPV	1	Katzen	Peritonitis, granulomatöse Entzündungen in allen Organen
Humanes Coronavirus	HCV	2	Mensch	Respiratorische Erkrankung
Mäuse-Hepatitis-Virus	MHV	4	Maus	Encephalitis, Hepatitis, Durchfall
Übertragbares Gastroenteritis-Virus	TGEV	1	Schwein	Durchfall
Hämagglutinierendes Encephalomyelitis-Virus	HEV	1	Schwein	Kümmern und Erbrechen, Encephalitis
Epizootisches Virusdiarrhoe-Virus	EVD	1	Schwein	Durchfall
Ratten-Coronavirus	RCV	2	Ratte	Respiratorische Erkrankung
Bluecomb-Virus der Pute	TCV	1	Pute	Enteritis

Das Nukleokapsid ist helikal-symmetrisch aufgebaut und enthält ein Ribonukleoprotein, das eine Spiralstruktur mit einem Durchmesser von ca. 10-20 nm aufweist (Lomniczi, 1977; Schocketman et al., 1977; Yogo et al., 1977; Davies et al., 1981). Wahrscheinlich enthält der helikale Komplex globuläre Untereinheiten, die das ganze Core umgeben (Kenny und Johnson-Lussenburg, 1975/1976; Macnaughton et al., 1978; Caul et al., 1979).

Mit Detergentien (NP-40, Triton-X-100) kann das Nukleokapsid aus dem Virion gelöst und im Saccharosegradienten bei einer Dichte von ca. 1,27-1,28 g/ml isoliert werden (Wege et al., 1979; Sturman et al., 1980).

Coronaviren haben eine einsträngige positive RNS mit einem Molekulargewicht von $3,8-6,9 \times 10^6$ Daltons (Mahy, 1981; Siddell et al., 1982).

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Molekulargewichte der Nukleinsäure verschiedener Coronaviren.

Da die Nukleinsäure von Coronaviren größer als die von anderen bekannten Einzelstrang-RNS-Viren ist, wird vermutet, daß sie mehr als 12 große (50K) Polypeptide kodieren kann (Mahy, 1981). Die RNS ist am 3'-Ende polyadenyliert und enthält in diesem Bereich rechnerisch 70-90 Adenylreste (Yogo et al., 1977; Macnaughton und Madge, 1978).

Das 5'-Ende der RNS von MHV (Lai und Stöhlman, 1978) und IBV (Stern und Kennedy, 1980) ist methyliert und dient bei der Virusreplikation als m-RNS. T₁-Oligonukleotid-Kartierung zeigte, daß die gesamte RNS für die Replikation benötigt wird (Lomniczi und Kennedy, 1977; Lai et al., 1981; Lai und Stöhlman, 1981a; Leibowitz et al., 1981).

Tabelle 2: Molekulargewichte der RNS verschiedener Corona-virus-Stämme. Die Größenbestimmungen wurden mit folgenden Methoden:

A: Elektrophorese mit denaturierter RNS

B: Elektrophorese mit nativer RNS

C: elektronenmikroskopische Größenmessung durchgeführt (modifiziert nach Siddell et al., 1982).

Virus	Größe ($\times 10^{-6}$)	Methode	Literaturangabe
JBV Beaudette	6,9	A	Stern und Kennedy, 1980
	5,8	B	Macnaughton, 1978
	5,8	B	Davies et al., 1981
	6,1-6,6	C	Macnaughton und Davies, 1980
MHV-A 59/JHM	5,4	A	Lai und Stohlman, 1978
A 59	5,6	B	Spaan et al., 1981; van der Zeijst et al., 1981
A 59	6,1	A	Leibowitz und Weiss, 1981
JHM	6,7	A	Wege et al., 1981b
	5,4-6,5	B	Wege et al., 1978
A 59/JHM	6,0	B	Weiss und Leibowitz, 1981
3	5,8	B	Macnaughton, 1978
HCV 229 E	5,8	A	Macnaughton und Madge, 1978
	6,5	B	Hierholzer et al., 1981
	6,0	B	Weiss und Leibowitz, 1981
OC-43	6,1	B	Macnaughton und Madge, 1978; Hierholzer et al. 1981
TGE Purdue	6,8	B	Brian et al., 1980
BCV Mebus	3,8	B	Guy und Brian, 1979

Genomvariationen wurden sowohl bei MHV- als auch bei IBV-Isolaten nachgewiesen. Hybridisierungen mit MHV-spezifischer c-DNS gegen verschiedene MHV-Serotypen und -Varianten zeigten eine große Sequenzübereinstimmung zwischen MHV-A 59 und MHV-3, während MHV-JHM, MHV-1, MHV-2 und MHV-S große Sequenzunterschiede aufwiesen. Bei der Hybridisierung derselben c-DNS gegen HCV 229-E wurde dagegen keine Homologie festgestellt (Weiss und Leibowitz, 1981). Mit Hilfe der T₁-Oligonukleotid-"Fingerprint"-Technik wurden ferner Genomvarianten bei verschiedenen neurovirulenten Stämmen von MHV beobachtet. Die Variationen scheinen unabhängig von der serologischen Verwandtschaft aufzutreten (Lai und Stohlman, 1981a; Wege et al., 1981a; Weiss und Leibowitz, 1981). Eine ähnliche Untersuchung der RNS von 13 IBV-Isolaten ergab 11 verschiedene "Fingerprints", nicht nur bei verschiedenen Serotypen, sondern auch innerhalb eines Serotyps (Clewley et al., 1981).

Coronaviren enthalten verschiedene Strukturproteine. Das Nukleokapsid der Coronaviren enthält neben der RNS ein nichtglykolisiertes Nukleokapsidprotein mit einem MG von etwa 50-60 K, welches phosphoryliert (Stohlman und Lai, 1979; Lomniczi und Moser, 1981; Rottier et al., 1981a; Siddell et al., 1981; Stern et al., 1981) und relativ reich an Arginin- und Glutaminsäureresten ist (Sturman, 1977). Das 64 K-Virusprotein von HEV kann mittels Bromelain-Behandlung nicht aufgespalten werden, was darauf hinweist, daß es im Innern des Virions liegen muß (Callebaut und Pensaert, 1980). Bei dem MHV-Protein sind speziell die Serinreste phosphoryliert (Stohlman und Lai, 1979; Siddell et al., 1981). 1981 konnten Siddell et al. zeigen, daß gereinigte MHV-JHM-Virionen eine Proteinkinaseaktivität enthalten, die speziell das Nukleokapsidprotein 60 K in vitro phosphoryliert. Dieses Enzym weist die typischen Charakteristika der cyclo-AMP-abhängigen Proteinkinase auf. Bisher ist jedoch unbekannt, ob das Enzym vom Virus kodiert wird oder ein eingeschlossenes Wirtsenzym ist. Ebenso ist es offen, ob es für die Phosphorylierung der

Nukleoproteine verantwortlich ist, die in das Virion eingebaut werden. Auch ist die Funktion der Phosphorylierung von Nukleokapsidproteinen bisher unklar, ebenso die Wechselbeziehung von Nukleokapsid-Ribonukleoprotein und dem Matrixprotein der Hülle, die Siddell et al. (1981) beschrieben haben.

Eine weitere Gemeinsamkeit der Coronaviren ist ein Matrixprotein mit einem MG von 20-30 K (Hierholzer et al., 1972; Hierholzer, 1976), das glykolysiert ist. Rottier et al. (1981b) sowie Stern et al. (1981) beschrieben zusätzlich ein bis vier Polypeptide mit einem niedrigeren MG, welche nur teilweise glykolysiert sind. Peptid-Kartierung nach Trypsinverdauung (Stern et al., 1981), sowie in vitro Translationsstudien (Lit. bei Siddell et al., 1982) haben bei IBV und MHV eine gute Übereinstimmung der Primärstruktur des Matrixproteins ergeben.

Callebaut und Pensaert (1980) beschrieben für den HEV-Stamm VW-572 zwei Glykoproteine mit einem MG von 31 K und 32 K, die bei der Behandlung mit verschiedenen Detergentien (Bromelain, Triton-X-100) ein ähnliches Verhalten zeigen. Beim Erhitzen mit Merkaptoethanol aggregieren ca. 20% dieser Proteinmoleküle zum Glykoprotein 54 K. Ähnlich verhält sich das 23 K-Glykoprotein des MHV-Stammes A-59 beim Erhitzen mit SDS (Sturman, 1977). Diese Aggregation wird auf die Bildung von hydrophoben Zwischenprodukten zurückgeführt. Auf Grund dieser Tatsache kann die unterschiedliche Anzahl von Proteinen, ca. 7-12 (Macnaughton und Madge, 1977), bis zu 14 (Collins et al., 1976) und bis zu 16 (Bingham, 1975) bei IBV erklärt werden. Durch Behandlung mit einer Virusprotease (Bromelain) gehen über 20% der Glykoproteine 31 K und 32 K verloren, der Rest bildet ein 25 K-Polypeptidprotein. Dieser nicht glykosylierte, hydrophobe Rest muß den größeren, inneren Teil der Glykoproteine 31 K und 32 K darstellen, da der kleinere glykosylierte Concanavalin-A-bindende Teil aus der Lipidmembran entfernt wurde (Sturman, 1977; Lanser und Howard, 1980a). Daraus

muß gefolgert werden, daß der hydrophobe, disulfidbrückenreiche Anteil in die Lipidmembran integriert ist (Sturman, 1981).

Mit Hilfe von NP-40 kann das Virion bei 40°C in seine Komponenten zerlegt werden und die Nukleokapsid- und Hüllproteine im Dichtegradienten getrennt werden. Entmischen sich bei 37°C die niedermolekularen 25 K-Glyko- und Nukleokapsidproteine, so bilden sich stabile Komplexe (Sturman et al., 1980; Sturman, 1981) besonders zwischen dem Glykoprotein und der RNS. Dies weist auf einen weiteren Bereich im Protein hin, der in der Lipidmembran liegt und für die Wechselbeziehung zwischen Glykoprotein und Nukleokapsid verantwortlich sein muß. Das niedermolekulare Glykoprotein der Coronaviren scheint ferner die Eigenschaften und Funktionen eines Matrixproteins zu besitzen (Lit. bei Siddell et al., 1982). Es ist aber im Gegensatz zu den Matrixproteinen anderer behüllter RNS-Viren glykosyliert. Ein ähnliches Aggregationsverhalten zeigt das 23 K-Polypeptid von MHV A-59 (Sturman, 1977). Demgegenüber können die membrangebundenen Glykoproteine von TGEV, HCV OC-43 und HCV 229-E nicht mit Bromelain aufgespalten werden (Hierholzer et al., 1972; Garwes und Pocock, 1975; Hierholzer, 1976). Weiterhin beschrieben Stern et al. (1981) ein IBV-Polypeptid mit einem MG von 14 K, das scheinbar keine Beziehung zu den anderen niedermolekularen Proteinen von IBV-Virionen hat und sich weiterhin von dem 14,5 K-Polypeptid des MHV-Stammes A-59 (Rottier et al., 1981b) unterscheidet.

Das Matrixprotein von MHV A-59 enthält eine Oligosaccharidkomponente, die sich deutlich von den vorher beschriebenen Virusglykoproteinen unterscheidet. Das Molekül hat ein MG von ca. 23 K und ist reich an Methioninresten (Sturman, 1977). Die Oligosaccharidseitenkette kann metabolisch mit Glucosamin und Galaktose, nicht aber mit Furanose und Mannose markiert werden (Sturman, 1977; Niemann und Klenk, 1981). Sie hat ein ähnliches Muster wie das Matrixprotein des bovinen Coronavirus (BCV) (Storz et al., 1981a). Die

Kohlenhydratseitenkette besteht aus Galaktose, N-acetyl-Glucosamin, N-acetyl-Galaktosamin und Neuraminsäure, die O-glykosidisch gebunden sind (Niemann und Klenk, 1981).

Die dritte Gruppe der Coronavirusproteine sind die Peplomerproteine mit einem MG von 80-200 K. Für die meisten Coronaviren sind ein oder mehrere, meist jedoch zwei große Peplomer-Glykoproteine beschrieben. Einen Überblick über die Proteine der verschiedenen Coronaviren gibt Tabelle 3. In vivo und vitro Translationsstudien sowie "Peptidfingerprints" nach Trypsinverdauung von MHV A-59-Polypeptiden (Sturman und Holmes, 1977) haben gezeigt, daß diese Proteine von einem gemeinsamen frühen Translationsprodukt abstammen, das post Translation modifiziert wurde.

Mit Pronase oder Harnstoff können die Peplomerproteine von den Virionen abgetrennt werden. Gleichzeitig kommt es zum Verlust der Infektiosität (Hierholzer et al., 1972, Garwes und Pocock, 1975; Garwes et al., 1976; Macnaughton et al., 1977; Pocock und Garwes, 1977; Sturmann, 1977; Sturman und Holmes, 1977; Wege et al., 1979; Callebaut und Pensaert, 1980; Macnaughton, 1980; Sugiyama und Amano, 1980; Waday und Westaway, 1981). Die 25 K-Hüllproteine aggregieren nach Detergentienbehandlung und formen Strukturen, die elektronenmikroskopisch als Peplomerrosetten erscheinen (Collins und Alexander, 1980b; Sturman et al., 1980). Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß die großen hochmolekularen Glykoproteine die pedalähnlichen Strukturen der Krone, die Peplomeren, formen.

Bei HEV können die Glykoproteine 76 K, 130 K und 180 K mit Bromelain vollständig von den Virionen abgelöst werden (Callebaut und Pensaert, 1980). Das vom kompletten Virus isolierte Glykoprotein 140 K zerfällt beim Erhitzen mit Merkaptoethanol in das Glykoprotein 76 K, das in hydrophoben Zwischenreaktionen aggregiert und das Glykoprotein 120 K bildet. Dies lässt sich durch eine Triton-X-100-Behandlung nachweisen, bei der das Glykoprotein 120 K in das Glykoprotein 76 K gespalten wird. Letzteres bindet sich an die Virusrezeptoren der Zelle und ist für die

Tabelle 3: Übersicht über die Molekulargewichte der verschiedenen Proteine von Coronaviren. Das angegebene Molekulargewicht beträgt x 1000 Daltons. Die verwendeten Abkürzungen bedeuten: P=Protein, Gp=Glykoprotein, Pp=Phosphoprotein, Glp=Glykolipidprotein. Die hochgestellten Buchstaben stehen für P=Peplomer, N=Nukleokapsid, M=Matrix und bezeichnen die Lage des Proteins im Virion (mod. nach Siddell et al., 1981).

Virus	Peplomerprotein	Kapsidprotein	Matrixprotein	Literatur
IBV-Mass	Gp94 ^P , Gp84 ^P	P54 ^N	Gp30 ^M , Gp28 ^M	Cavanagh, 1981
IBV-Beau	Gp90, Gp84	Pp51	P36, Gp31 P28, P23, P14	Stern et al., 1981
IBV-Mass	Gp90 ^P	P52 ^N	Gp29, Gp26	Laenser und Howard, 1980a, 1980b
IBV-Beau/Conn/Mass	Gp130 ^P , Gp105 ^P	P51 ^N	P31	Macnaughton und Madge, 1977; Macnaughton et al., 1977; Macnaughton und Davies, 1980; Davies et al., 1981
IBV-Several	Gp210 ^P , Gp185 ^P , Gp91	P51	Gp25, P23	Wadley und Westaway, 1981
IBV-Beau/Conn	(tc)170 ^P , Gp94/98 ^P (egg)P110 ^P , Gp75	Pp50 ^N	Gp30/28 ^M , Gp26 ^M	Lomiczi und Moser, 1981
MTV-A 59	Gp180/90 ^P	P50 ^N	Gp23 ^M	Sturman, 1977; Sturman und Holmes, 1977;
MTV-A 59	Gp180/90 ^P	P50	Gp23	Sturman et al., 1980
MTV-A 59/1/2/3	P180, P90 (P65 ^B)	Pp 50	P23	Niemann und Klenk, 1981
MTV-A 59	P150, P89	P60	P20-23	Stohlman und Lai, 1979; Lai und Stohlman, 1981a
MTV-JHM	P150, P100	P63	P18-23	Bond et al., 1979
MTV-JHM	Gp170 ^P , Gp98 ^P , Gp65 ^P	Pp60 ^N	Gp25 ^M , P23 ^M	Bond et al., 1981 Wege et al., 1979; Siddell et al., 1981

Tabelle 3: Fortsetzung

Virus	Peplomerprotein	Kapsidprotein	Matrixprotein	Literatur
MMV-3	Gp190 ^P , Gp100 ^P	P58 ^N	P25 ^M , Gp24 ^M	Obert et al., 1981
MMV-3	Gp170 ^P , Gp90 ^P	P50	Gp22, P20	Macnaughton, 1980
MMV-A 59	Gp180, Gp90	Pp54	Gp26,5, Gp25,5	Rottier et al., 1981a
MMV-DIVTM	Gp139 ^P , Gp110/100 ^P	P53 ^N	P24, P22, P114,5	Rottier et al., 1981b
HCY-229 E	Gp160 ^P , Gp105 ^P	P50	P38, P22	Sugiyama und Amano, 1980
HCY-229 E	Gp196, Gp165 ^P	P47	Gp24, P22	Macnaughton, 1980
HCY-OC 43	Gp191, Gp165, Gp104 ^P , Gp60	P47	Gp11, Gp117 ^M	Hierholzer, 1976
TCYV-FS 772/70	Gp200 ^P , P105, P80,5	P50 ^N	P30, Gp15	Hierholzer et al., 1972
OCV-I-71	Gp203	P50	Gp30, Gp28,5	Garwes und Pocock, 1975; Garwes et al., 1976
BCV-Yebus	Gp180, Gp90, Gp65	P50	Gp32, Gp23	Garwes und Reynolds, 1981
BCV-MS/F15	P125, P65	P50	Gp23	Storz et al., 1981a
HEV-Fs 254	Gp180 ^P , Gp125 ^P , Gp100 ^P	P56 ^N	P45, P26, P34, P28	Laporte und Bobulesco, 1981
HEV-VW	Gp180 ^P , Gp130 ^P , Gp76	P64	Gp26	Pocock und Garwes, 1977
			Gp32 ^M , Gp31 ^M	Callebaut und Penseert, 1980

Hämagglutinationsaktivität verantwortlich (Callebaut und Pensaert, 1980).

Das 130 K-Glykoprotein dagegen ist Triton-X-100-stabil und stellt die zweite Oberflächenprojektion dar (Callebaut und Pensaert, 1980). HEV VW-572 zeigt einen ähnlichen Membranaufbau wie TGEV und MHV-JHM (Garwes und Pocock, 1975; Wege et al., 1979).

Bei MHV A-59 wurden zwei verwandte Peplomerproteine mit einem MG von 90 K und 180 K isoliert, deren Entstehung bisher noch unklar ist. Nach Trypsinverdauung sind die "Fingerprints" von beiden Proteinen annähernd identisch (Sturman und Holmes, 1977). Das schwere Protein ist trypsinsensitiv; wie die Glykoproteine von Orthomyxoviren (Klenk und Rott, 1980) zerfällt es bei der Trypsinverdauung in die 90 K-Form (Sturman und Holmes, 1977). Die Anteile des 90 K- und 180 K-Proteins im Virus hängen von der proteolytischen Aktivität der Wirtszelle ab (Mahy, 1981). Beide Polypeptide enthalten zahlreiche Disulfidbrücken und freie Sulfhydrylgruppen, die zur Aufrechterhaltung der Struktur und der Antigenfunktion notwendig sind (Alexander und Collins, 1975; Pocock und Garwes, 1975; Sturman, 1981). Die Bedeutung der Peplomerproteine läßt sich mit Tunikamyzin-Studien nachweisen. Tunikamyzin hemmt die Aneinanderreihung von Dolichol verketteten N-acetyl-Glucosaminen (Lit. bei Siddell et al., 1982). In Coronavirus infizierten, mit Tunikamyzin behandelten Zellen, werden inkomplette Viruspartikel gebildet, denen das Peplomerprotein fehlt (Sturman, 1981; Holmes et al., 1981; Rottier et al., 1981b; Storz et al., 1981a). Diese Virionen können nicht an die Wirtszellmembranen adsorbieren und sind daher nicht infektiös. Die Peplomerproteine scheinen ein entscheidender Faktor für die Virusadsorption an der Zelloberfläche zu sein. Um die weiteren Oberflächenfunktionen, wie Hämagglutination und Hämadsorption als reine Peplomerfunktionen zu betrachten, fehlen jedoch noch Beweise (Kapikian et al., 1972; Bingham et al., 1975; Bridger et al., 1978;

Pocock, 1978; Callebaut und Pensaert, 1980; Sugiyama und Amano, 1980; Walker und Cleater, 1980; Holmes et al., 1981; Storz et al., 1981b).

Einige Coronaviren besitzen noch weitere Glyko- oder Oberflächenproteine, die aber nicht konstant gefunden werden. Es sind häufig kleine Proteine, deren Bedeutung unklar ist. Vermutlich laufen während der Morphogenese von Coronaviren proteolytische Vorgänge ab, ähnlich wie bei Ortho- und Paramyxoviren, in die die Oberflächenproteine einbezogen werden (Dea et al., 1980; Storz et al., 1981b).

Alle Coronaviren besitzen zusätzlich zu ihrem Nukleokapsid eine Lipidhülle, in die periphere Struktur-, Matrix- und Peptomerproteine eingelagert sind. Mit schonenden Detergentien (z.B. Triton-X-100, NP-40) können Proteine abgespalten oder nach vollständiger Zerlegung des Virions durch Fraktionierung getrennt werden (Garwes et al., 1976; Wege et al., 1979; Callebaut und Pensaert, 1980; Collins und Alexander, 1980b; Lanser und Howard, 1980b; Sturman et al., 1980; Cavanagh, 1981; Sturman, 1981).

In der Virushülle von TGEV sind ferner Lipide nachgewiesen worden, die als Phospho-, Glykolipide, Cholesterin, Di- und Triglyzeride und freie Fettsäuren in Größenordnungen vorkommen, die annähernd denen der Zelle entsprechen.

Da die Virusausschleusung durch "Budding" in Zytoplasma-Zisternen erfolgt, werden Cholesterin und freie Fettsäuren, die in den Zellmembranen enthalten sind, selektiv in die Virusmembran aufgenommen. Die Viruslipidzusammensetzung und -konzentration ist von der Wirtszelle abhängig (Pike und Garwes, 1977).

2.2. Antigenverwandtschaften bei den Coronaviren

Die Kenntnisse über die Antigenverwandtschaften zwischen den verschiedenen Coronaviren sind noch unvollständig. Die in Tabelle 4 dargestellten Beziehungen basieren auf den Ergebnissen von Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Immunfluoreszenz, Immunelektropenmikroskopie, Hämagglutinationshemmungs- und Neutralisationstest. Die Resultate zeigen, daß sich die Coronaviren antigenetisch in vier Gruppen aufgliedern, die untereinander keine Kreuz-immunreaktion zeigen.

In serologischen Studien mit isolierten Virusproteinen von TGEV (Garwes et al., 1978), HCV 229-E und MHV-3 (Macnaughton et al., 1981) sowie HCV OC-43 und 229-E (Schmidt und Kenny, 1981) wurde das Peplomerprotein als Antigen für die Bildung neutralisierender Antikörper identifiziert. Bei BCV ist das Peplomerprotein für die Komplementbindung und Hämagglutination verantwortlich (Storz und Rott, 1981).

Tabelle 4: Antigenverwandte Coronavirusgruppen
(modifiziert nach Wege et al., 1982).

SÄUGETIER-CORONAVIREN

<u>Gruppe 1</u>	<u>Gruppe 2</u>	<u>Gruppe 3</u>
Mäuse-Hepatitis-Virus	Humanes Coronavirus 229-E	Epizootische Virusdiarrhoe
Humanes Coronavirus OC-43	Übertragbares Gastroenteritis-Virus	
Bovines Coronavirus	Felines Infektiöses-Peritonitis Virus	
Hämagglutinierendes-Encephalomyelitis-Virus	Canines Coronavirus	
Ratten-Coronavirus		

GEFLÜGEL-CORONAVIREN

<u>Gruppe 4</u>	<u>Gruppe 5</u>
Infektiöses Bronchitis Virus (Geflügel)	Bluecomb-Virus der Pute

2.2.1. Gruppe 1

Die Antigenbeziehungen zwischen Coronaviren innerhalb der Gruppe 1 sind zusammenfassend in Abbildung 2 dargestellt.

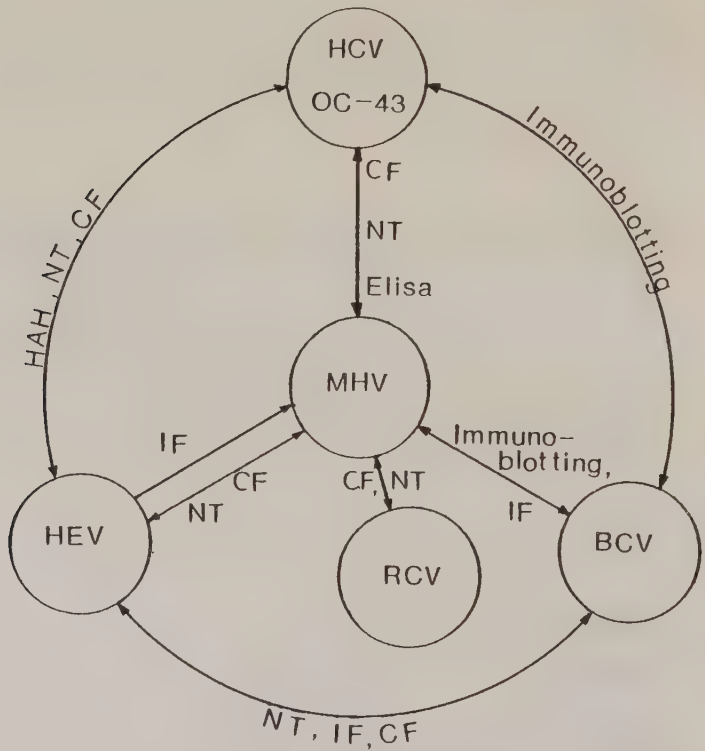


Abb. 2: Antigenverwandtschaften bei Coronaviren der Gruppe 1.
CF = Komplementbindungsreaktion, Elisa = Enzyme-linked immunosorbent assay, HAH = Hämagglutinationshemmungstest, IF = Immunfluoreszenz, NT = Neutralisationstest.

BCV = Bovines Coronavirus, HCV = Humanes Coronavirus, HEV = Hämagglutinierendes Encephalomyelitis-Virus, MHV = Mäuse-Hepatitis-Virus, RCV = Ratten-Coronavirus.

Mäuse-Hepatitis-Virus (MHV)

McIntosh et al. (1969) fanden mittels Neutralisationstest und Komplementbindungsreaktion eine Antigenverwandtschaft zwischen MHV-3 und HCV OC-43, aber nicht mit HCV 229-E und IBV. Das in Mäusen hergestellte HCV OC-43-Immunserum neutralisierte MHV viel besser als das MHV-Immunserum das HCV OC-43. Bei der heterologen Komplementbindungsreaktion sprach nur das MHV-Immunserum auf HCV OC-43 an.

Die Verwandtschaft zwischen MHV-3 und HCV OC-43 wurde von Macnaughton (1980) bestätigt. Im ELISA reagierte HCV OC-43 und MHV-3 mit dem jeweils heterologen Kaninchenimmunserum. Mit HCV 229-E zeigte sich bei keinem der beiden Coronaviren eine positive Reaktion. Auch Kraaijeveld et al., (1980) konnten im ELISA keine Antigenverwandtschaft zwischen MHV-3 und HCV 229-E finden.

Die Antigenbeziehungen von MHV-3 zu sieben anderen Coronaviren untersuchten Pederson et al., (1978) mit der direkten und indirekten Immunfluoreszenz. Dabei zeigte MHV-3-Antiserum mit HCV OC-43 und HEV 67-N eine kräftige, mit BCV eine schwache und mit TGEV, FIPV, HCV 229-E und CCV keine Fluoreszenz. MHV-3 fluoresziert mit HCV OC-43-Antiserum kräftig, während die Fluoreszenz mit BCV- und HEV 67-N-Antiserum gerade noch bestimmbar war. Mit den Antiseren von TGEV, FIPV, HCV 229-E und CCV war keine Reaktion erkennbar.

Die von Bradburne (1970) beschriebene Kreuzneutralisation zwischen MHV-3 und HCV 229-E-Immunseren wurde mehrfach widerlegt und muß als falsch betrachtet werden.

Mit der Komplementbindungsreaktion stellten Parker et al. (1970) eine Antigenbeziehung zwischen RCV und MHV fest. Kaye et al. (1977) wiesen in der Komplementbindungsreaktion eine Antigenverwandtschaft zwischen MHV und HEV nach. MHV-Immunserum reagierte gut mit HEV, während das HEV-Immunserum auf MHV nur schlecht ansprach.

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese trennten Hogue et al. (1984) die Virusproteine von MHV, BCV und HCV OC-43 auf. BCV und HCV OC-43 zeigten je vier ähnliche Proteine, während MHV, dem das Glykoprotein 140 K, das Hämagglutinin, fehlt, nur drei aufwies. Die Immunoblots mit spezifischen Immunsereen gegen jedes der vier Proteine von BCV ergaben vier mit HCV OC-43 und drei mit MHV verwandte Proteine. Diese Ergebnisse zeigen, daß BCV mit HCV OC-43 antigenetisch enger verwandt ist als mit MHV.

Bei Betrachtung aller bisher bekannten Daten über die Antigenverwandtschaft von MHV zu den anderen Coronaviren ist festzustellen, daß MHV am engsten mit HCV OC-43 verwandt ist. Der Verwandtschaftsgrad mit RCV, HEV und BCV nimmt in der genannten Reihenfolge ab.

Hämagglutinierendes Encephalomyelitis Virus (HEV)

1976 stellte Sharpee mit der Komplementbindungsreaktion und dem Neutralisationstest eine Antigenverwandtschaft zwischen HEV 67-N und BCV fest. Eine Verwandtschaft zwischen HEV 67-N und HCV OC-43 beschrieben Kaye et al. (1977). Im Hämagglutinationshemmungstest, in der Komplementbindungsreaktion und im Neutralisationstest mit Mäuseimmun- und Hyperimmunsereen zeigten beide Coronaviren eine Kreuzreaktion, wobei das HCV OC-43-Immunserum 2-4 fach höhere Titer gegen HEV aufwies, als umgekehrt. HCV OC-43-Hyperimmunserum hemmt HEV im Hämagglutinationshemmungstest 4 mal besser, neutralisiert HEV 3 mal besser und zeigt mit HEV eine 2 mal bessere Komplementbindungsreaktion als umgekehrt. Antikörper gegen HCV OC-43 aus menschlichen Seren von Erwachsenen reagierten in allen drei Testmethoden mit HEV 67-N, jedoch war in allen Fällen der homologe Antikörpertiter höher. Wurden die Erwachsenen mit humanen Coronavirusstämmen, außer OC-43, infiziert, so konnte keine serologische Beziehung mit HEV 67-N festgestellt werden.

Mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion fanden die gleichen Autoren bei Verwendung spezifischer Mäuse-Hyperimmunseren ferner eine Ein-Weg-Kreuzreaktion zwischen HEV 67-N und MHV, wobei MHV-Hyperimmunserum mit HEV 67-N in der Komplementbindungsreaktion ca. 16 mal besser ansprach als umgekehrt.

Pederson et al. (1978) untersuchten mittels indirekter und direkter Immunfluoreszenz die Antigenbeziehungen von acht Coronaviren. HEV 67-N-Antiserum fluoreszierte nur im homologen System mit HEV 67-N kräftig. Mit HCV OC-43 und BCV war die Fluoreszenz mittelgradig und mit MHV-3 gerade noch sichtbar, während TGEV, FIPV, HCV 229-E und CCV negativ waren. Das Antigen HEV 67-N fluoreszierte kräftig mit MHV-, BCV- und HCV OC-43-Antiserum, nicht jedoch mit Antiserum gegen TGEV, FIPV, HCV 229-E und CCV.

Die von Phillip et al. (1971) und Bohac et al. (1976) früher beschriebene Antigenbeziehung zwischen HEV 67-N und TGEV in der Immunpräzipitation wird in der Literatur nicht bestätigt.

Hogue et al. (1984) berichteten, daß HEV ein reduziertes, über Disulfidbrücken verbundenes Glykoprotein 140 K besitzt, ähnlich wie BCV und HCV OC-43. Dieses Glykoprotein trägt die hämagglutinierende Eigenschaft. Das Ergebnis läßt auf eine Verwandtschaft zwischen HEV, BCV und HCV OC-43 schließen.

Faßt man die oben genannten Daten zusammen, so ist HEV mit HCV OC-43 enger antigenverwandtschafts als mit BCV und MHV.

Bovines Coronavirus (BCV)

Die Antigenverwandtschaft von BCV zu sieben anderen Coronaviren untersuchten Pederson et al. (1978) mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz. BCV fluoreszierte mit HEV 67-N am kräftigsten, mit HCV OC-43 mittelgradig und mit

MHV-3 war die Fluoreszenz gerade noch sichtbar. Mit den Antiseren von MHV-3, HCV OC-43 und HEV 67-N zeigte BCV eine mittelstarke Fluoreszenz, keine hingegen mit TGEV-, FIPV-, HCV 229-E und CCV-Antiserum, ebenso wenig diese Coronaviren mit BCV-Hyperimmunserum. Eine Kreuzreaktion besteht nach dieser Untersuchung zwischen HEV 67-N, HCV OC-43 und MHV-3. Schon 1976 stellte Sharpee die Verwandtschaft von BCV mit HEV 67-N durch Virusneutralisation und Komplementbindung fest.

Storz und Rott (1981) wiesen neutralisierende Antikörper in Humansen nach, welche die Infektiosität von BCV vollständig neutralisieren. Zu dem gleichen Ergebnis waren Sharpee und Mebus schon 1975 gekommen.

Die Ergebnisse von Gerna et al. (1981) bestätigten die enge Antigenverwandtschaft von BCV mit HCV OC-43. Im Hämagglutinations- und Neutralisationstest, sowie mit Hilfe der Immunperoxidase-Antikörperteknik zeigten spezifische Mäuseimmunseren eine Kreuzreaktion, wobei die Nukleokapsidproteine eine größere Verwandtschaft zeigten als die Peplomerproteine. Nach Entfernung der unspezifischen Hemmstoffe aus den Immunseren mit Phospholipase C sank der Titer im homologen System von 64 mal höher im Vergleich zum heterologen System auf 8-16 mal höher ab. D.h. im nicht inaktivierten Serum befinden sich unspezifische Hemmstoffe gegen BCV und HCV OC-43 (Hovi, 1978). 1982 bestätigten Gerna et al. diese Verwandtschaft durch den Nachweis von membranassoziierten Antigenen mit Hilfe der indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Technik. Die von Kaye et al. (1977) sowie Sharpee und Mebus (1975) beschriebene enge Antigenbeziehung zwischen BCV und HCV OC-43 muß jedoch kritisch betrachtet werden, da mit nicht inaktivierten Immunseren gearbeitet wurde.

Hogue et al. (1984) zeigten mit Hilfe von Immunoblots, daß BCV vier identische Proteine mit HCV OC-43 und drei mit MHV hat. Dieses Proteinmuster weist daraufhin, daß BCV mit HCV OC-43 enger verwandt ist als mit MHV A-59.

Aus den beschriebenen Ergebnissen geht hervor, daß BCV antigenetisch sehr eng mit HCV OC-43 und mit HEV, jedoch weniger nah mit MHV verwandt ist.

Humanes Coronavirus OC-43 (HCV OC-43)

1969 fanden McIntosh et al. mit Hilfe des Neutralisationstests und der Komplementbindungsreaktion eine Antigenverwandtschaft zwischen HCV OC-43 und MHV, jedoch nicht mit HCV 229-E. In Übereinstimmung damit konnten Monto et al. (1977) mit der Immunfluoreszenztechnik keine Verwandtschaft zwischen HCV OC-43 und HCV 229-E finden.

Kaye et al. (1977) untersuchten die Antigenbeziehungen zwischen HCV OC-43 und HEV 67-N mit dem Neutralisations-, dem Hämagglutinationshemmungstest und der Komplementbindungsreaktion mit spezifischen Mäuseimmun- und Hyperimmunseren. Mit allen Seren und verwendeten Techniken trat eine Kreuzreaktion ein, wobei HEV-Immunserum mit HCV OC-43 2-4 fach besser reagierte als das HCV OC-43-Immunserum mit HEV. Von den untersuchten Kinderseren, die Antikörper gegen HCV OC-43 und HCV 229-E hatten, wiesen ca. 25% auch Antikörper gegen HEV auf. Serum jedoch, das nur Antikörper gegen HCV 229-E hatte, reagierte nicht mit HEV. Diese Ergebnisse, sowie das Vorkommen von HEV- und HCV OC-43-Antikörper in menschlichen Seren, lassen auf eine heterologe Neutralisation zwischen HEV und HCV OC-43 schließen.

Pederson et al. (1978) untersuchten mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Antigenbeziehung von HCV OC-43 zu sieben anderen Coronaviren. Das HCV OC-43-Antiserum fluoreszierte kräftig mit MHV-3 und HEV 67-N, jedoch nur mittelgradig mit BCV. Als Antigen fluoreszierte HCV OC-43 kräftig mit MHV-Antiserum und mittelgradig mit BCV und HEV 67-N. HCV OC-43 und sein Antiserum zeigten keine Reaktion mit TGEV, FIPV, HCV 229-E, CCV und deren Antiseren.

Eine Reaktion im ELISA mit MHV-3, jedoch nicht mit HCV 229-E beschrieb Macnaughton (1980). Storz und Rott (1981) fanden in Humanseren neutralisierende Antikörper gegen BCV. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um HCV OC-43-Antikörper handelte. Gerna et al. (1981, 1982) stellten eine enge Antigenbeziehung zwischen BCV und HCV OC-43 im Hämagglutinationshemmungs-, Neutralisationstest und mit der Immunperoxidase-Antikörpertechnik fest.

1981 untersuchten Schmidt und Kenny die Antigenität zwischen HCV OC-43 und HCV 229-E mittels zweidimensionaler Immunelektrophorese. Beide Viren zeigten mit dem homologen Kaninchenserum je drei Antigene, jedoch konnte weder im Neutralisations- noch im Plaquereduktionstest oder in der Immunelektrophorese eine Verwandtschaft festgestellt werden.

Auch Bradburne (1970), Hierholzer et al. (1972) und Hierholzer (1976) konnten in der doppelten Immundiffusion keine Verwandtschaft zwischen HCV OC-43 und HCV 229-E feststellen. Ebenso wenig fand Schmidt (1984) weder im ELISA noch im Neutralisationstest und in der Komplementbindungsreaktion eine Antigengemeinsamkeit zwischen HCV OC-43 und HCV 229-E.

Hogue et al. (1984) zeigten mit der Immunblotting-Technik, daß HCV OC-43 eng mit BCV und etwas entfernter mit MHV A-59 verwandt ist.

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist HCV OC-43 mit BCV am nächsten verwandt. Aber auch mit MHV und HEV besteht eine enge Beziehung.

Coronaviren der Ratten (RCV)

Hartley et al. (1964) isolierten ein Coronavirus aus der Lunge von Ratten, das sich morphologisch von MHV unterscheidet, serologisch jedoch eine Antigenverwandtschaft aufweist.

1970 fanden Parker et al., daß RCV in der Komplementbindungsreaktion nahezu doppelt so empfindlich für die Bestimmung von MHV-Antikörpern ist als umgekehrt. Beide Viren zeigten im Neutralisationstest nur eine geringe Kreuzreaktion. Bei dem Vergleich von RCV- und MHV-Immunsereen zu natürlich vorkommenden Antikörpern, reagierte RCV in der Komplementbindungsreaktion um das 3 fache empfindlicher als MHV. Die Autoren schließen hieraus auf eine enge serologische Antigenverwandtschaft zwischen RCV und MHV.

Ein mit dem von Hartley isolierten Coronavirus antigenetisch verwandter, jedoch unterschiedlicher zweiter Coronavirustyp, ist das von Bhatt et al. (1972) beschriebene Sialodacryoadenitis-Virus. Es zeigt im Neutralisationstest und in der Komplementbindungsreaktion eine enge antigenetische Verwandtschaft mit MHV-3.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß RCV nur mit MHV antigenverwandt ist.

2.2.2. Gruppe 2

Abbildung 3 stellt die Antigenbeziehungen zwischen Coronaviren der Gruppe 2 zusammenfassend dar.

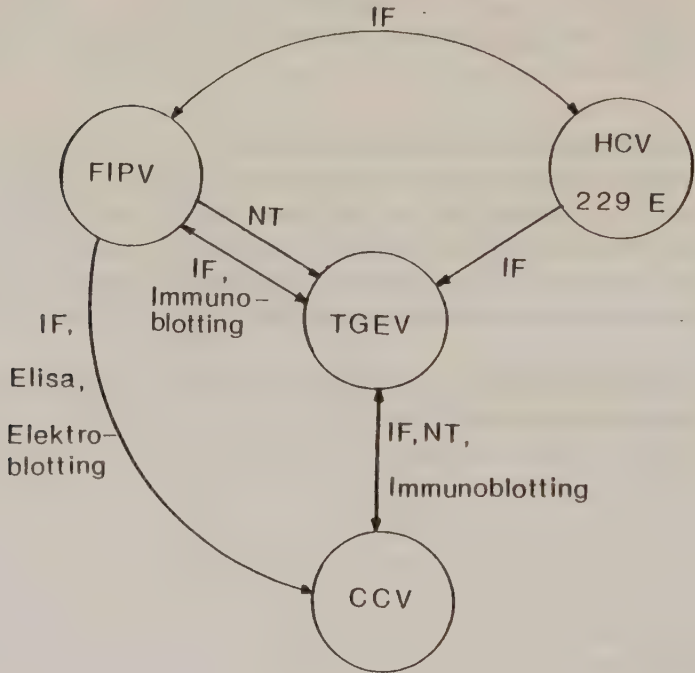


Abb. 3: Antigenverwandtschaften bei Coronaviren der Gruppe 2.

Elisa = Enzyme-linked immunosorbent assay, IF = Immunfluoreszenz, Immunoblotting und NT = Neutralisationstest.

CCV = Canines Coronavirus, FIPV = Felines Infektiöses Peritonitis Virus, HCV 229-E = Humanes Coronavirus 229-E, TGEV = Übertragbares Gastroenteritis Virus.

Die Pfeile bezeichnen die Richtung der Kreuzreaktion.

Transmissibles Gastroenteritis Virus (TGEV)

1974 fanden Binn et al. bei Verwendung von Neutralisations-test und Komplementbindungsreaktion, daß CCV-Immunserum TGEV neutralisiert. Ergänzend hierzu stellten Witte et al. (1977) fest, daß FIPV-Antikörper TGEV neutralisieren, jedoch TGEV-Antiserum FIPV nicht neutralisiert. Im Aszites an feliner infektiöser Peritonitis erkrankter Katzen beschrieben Reynolds et al. (1977) hohe neutralisierende Antikörper-Titer gegen TGEV. Woods und Pederson (1979) infizierten Katzen mit TGEV und konnten nachweisen, daß neutralisierende Antikörper gegen TGEV gebildet wurden, welche auch FIPV in niedrigen Titern neutralisierten. Saugferkel dagegen, die mit FIPV infiziert wurden, bildeten keine nachweisbaren Antikörper gegen TGEV. Diese Tiere waren auch nicht gegen eine TGEV-Infektion geschützt. Im Gegensatz dazu konnten Osterhaus et al. (1977) keine Neutralisation von TGEV mit hochtitrigen FIPV-Katzenimmunsereen nachweisen.

Pederson et al. (1978) beschrieben mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Antigenverwandtschaft von TGEV zu sieben anderen Coronaviren. TGEV-Antiserum fluoreszierte mit FIPV und CCV stark, mit HCV 229-E dagegen schwach. Das Antigen TGEV zeigte mit FIPV-Antiserum eine kräftige und mit HCV 229-E-Antiserum eine mittelstarke Fluoreszenz. Mit CCV, MHV, HEV, BCV und HCV OC-43 zeigte weder TGEV-Antiserum noch TGEV mit den entsprechenden Antiseren der genannten Coronaviren eine Fluoreszenz.

Die von Bohac et al. (1976) in der Immunpräzipitation gefundene Reaktion mit HEV 67-N wird von Pederson et al. (1978) ebensowenig bestätigt, wie die von Witte et al. (1977) beschriebene Beobachtung, daß TGEV-Antiserum nicht mit FIPV fluoresziert.

Reynolds et al. (1980) stellten in Kaninchen monospezifische Antiseren gegen CCV und TGEV, sowie in Schweinen und Katzen gegen TGEV her. FIPV, CCV und TGEV zeigten eine Kreuzreak-

tion im Neutralisationstest, aber die homologen Antikörpertiter waren ca. 10 mal höher. In Seren von 41 untersuchten Hunden war der neutralisierende Antikörpertiter gegen CCV 2,7 mal höher als gegen TGEV. Das Serum von 29 Katzen mit FIP und einem bekannten TGEV-Antikörpertiter neutralisierte CCV 12,3 mal besser als TGEV. Die Antiseren gegen BCV, HEV und HCV 229-E neutralisierten CCV und TGEV nicht.

1981 beschrieben Garwes und Reynolds verwandte Virusproteine bei TGEV und CCV. Horzinek et al. (1982) fanden in der Gelelektrophorese ähnliche Peplomer-, Nukleokapsid- und Hüllproteine bei TGEV, FIPV und CCV. In Immunoblots banden FIPV-Aszitesantikörper mit allen drei Proteinen dieser genannten Coronaviren, während TGEV-, FIPV- und CCV-Antikörper nur an die Nukleokapsid- und Hüllproteine banden. Im ELISA testeten die gleichen Autoren Reaktionen von TGEV-, FIPV- und CCV-Antikörpern mit dem Peplomer-, Nukleokapsid- und Hüllprotein von TGEV. TGEV- und FIPV-Antikörper reagierten mit dem Peplomer- und Hüllprotein von TGEV, während CCV-Antikörper nur sehr schwach mit dem Peplomer- und Nukleokapsidprotein reagierten. Die TGEV-Antikörper reagierten jedoch mit dem Nukleokapsidprotein von FIPV und CCV nahezu gleich stark.

TGEV ist nach diesen Befunden sehr eng mit FIPV und etwas weiter entfernt mit CCV und HCV 229-E verwandt.

Felines infektiöses Peritonitis-Virus (FIPV)

Witte et al. (1977) untersuchten die Antigenverwandtschaft zwischen TGEV und FIPV. Die Abdominalflüssigkeiten spontan an FIPV erkrankten oder experimentell infizierten Katzen wiesen niedrige bis mittlere TGEV-Titer auf. Die mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markierten FIPV-Antikörper zeigten eine deutliche Fluoreszenz mit TGEV- oder FIPV- infizierten Zellkulturen und dem Dünn-

darmepithel eines experimentell infizierten Ferkels. FITC-markierte TGEV-Immunglobuline vom Schwein reagierten ausschließlich mit TGEV-infizierten Zellkulturen und Dünndarmepithel. Diese Ergebnisse lassen auf eine partielle Antigenverwandtschaft zwischen TGEV und FIPV schließen.

Die Verwandtschaft mit sieben anderen Coronaviren bei Verwendung der Immunfluoreszenz beschrieben Pederson et al. (1978). FIPV zeigte mit TGEV-Antiserum eine kräftige und mit HCV 229-E-Antiserum eine mittelgradige Fluoreszenz. Das Antiserum gegen FIPV fluoreszierte mit TGEV und CCV stark, mit HCV 229-E gerade noch sichtbar. Dies widerspricht der von Witte et al. (1977) beschriebenen Beobachtung, daß TGEV-Antikörper nicht mit FIPV fluoreszierten.

Woods und Pederson (1979) stellten darüberhinaus fest, daß TGEV-Antikörper FIPV mit niedrigen Titern neutralisiert, FIPV-Antikörper TGEV jedoch nicht neutralisierten. Auch Osterhaus et al. (1977) beobachteten eine Neutralisation von TGEV bei Verwendung hochtitriger FIPV-Immunsereen.

Die Untersuchung von 29 Katzen mit FIP und einem bekannten TGEV-Antikörper-Titer ergab, daß FIPV-Antikörper 12,3 mal besser CCV neutralisierten als TGEV (Reynolds et al., 1980). Hieraus kann abgeleitet werden, daß FIPV mit CCV enger verwandt ist als mit TGEV. Horzinek et al. (1982) arbeiteten über die Antigenverwandtschaft zwischen diesen Viren auf molekularer Ebene. FIPV-Aszites-Antikörper von erkrankten Katzen neutralisierten TGEV. In der Immunpräzipitation binden FIPV-Aszites-Antikörper an alle drei Polypeptide (Peplomer-, Nukleokapsid- und Hüllproteine) von TGEV. Im Immunoblot binden FIPV-Serum-Antikörper ebenso wie TGEV- und CCV-Antiserum nur mit dem Nukleokapsid- und Hüllprotein von TGEV. Im ELISA reagierten FIPV-Serum-Antikörper mit dem Peplomer-, Nukleokapsid- und dem Hüllprotein von TGEV schwächer als Serum-TGEV-Antikörper, jedoch stärker als CCV-Antikörper.

Als Fazit ergibt sich, daß FIPV eine sehr enge Antigenverwandtschaft mit TGEV zeigt, jedoch mit CCV und HCV 229-E nur entfernt verwandt ist.

Canines Coronavirus (CCV)

Pederson et al. (1978) konnten mittels der direkten und indirekten Immunfluoreszenz eine schwache Antigenbeziehung zwischen CCV, TGEV und FIPV nachweisen. CCV-Antiserum ergab nur mit dem homologen Virus eine Fluoreszenz. Antiserumkonjugate von TGEV und FIPV zeigten eine deutliche Fluoreszenz mit CCV. MHV, HEV, BCV, HCV OC-43 und HCV 229-E sowie deren Immunseren waren negativ.

Binn et al. (1974) beschrieben, daß CCV-Immunserum mit TGEV reagiert, was im Widerspruch zu dem Ergebnis von Pederson et al. (1978) steht. Im Virusneutralisationstest reagierten FIPV-Antikörper 12,3 mal besser mit CCV als mit TGEV (Reynolds et al., 1980).

Garwes und Reynolds (1981) fanden mittels Gelelektrophorese Proteine (GP 204 bzw. GP 32 bzw. 30) mit ähnlichem Molekulargewicht bei CCV und TGEV.

Auf molekularer Ebene untersuchten Horzinek et al. (1982) die Antigenverwandtschaft von CCV, TGEV und FIPV. Dabei stellten die Autoren fest, daß CCV-Antiserum im Immunoblot schwach an das FIPV-Nukleoprotein bindet, jedoch gut mit dem CCV- und TGEV-Nukleokapsid- und dem Hüllprotein aller drei Viren reagiert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Garwes und Reynolds (1981) überein.

Im ELISA zeigte CCV-Immunserum eine schwache Reaktion mit dem Peplomer-, Hüll- und Nukleokapsidprotein von CCV, TGEV und FIPV. Mit dem Nukleokapsidprotein von FIPV war eine maximale Reaktion feststellbar (Horzinek et al., 1982).

Die beschriebenen Untersuchungen sprechen dafür, daß CCV enger mit TGEV als mit FIPV verwandt ist.

Humanes Coronavirus 229-E (HCV 229-E)

Zwischen HCV 229-E, HCV OC-43 und MHV konnten McIntosh et al. (1969) keine Antigenverwandtschaft finden. Auch Monto et al. (1977) konnten mit Hilfe der Immunfluoreszenz keine Verwandtschaft von HCV 229-E und HCV OC-43 feststellen. Über ähnliche Ergebnisse berichteten Kaye et al. (1977), Macnaughton (1980) und Gerna et al., (1980, 1981). Sie fanden keine Antigenverwandtschaft zwischen HCV 229-E mit MHV, BCV und HCV OC-43.

Pederson et al. (1978) beschrieben Immunfluoreszenz-Untersuchungen über die Antigenbeziehung von acht Coronaviren untereinander. HCV 229-E-Antiserum reagierte in der Immunfluoreszenz mit TGEV mittelkräftig und mit FIPV schwach. Als Antigen fluoreszierte HCV 229-E mit TGEV-Antiserum schwach und gerade noch erkennbar mit FIPV-Antiserum. CCV und dessen Immunseren waren negativ. Aus dieser Arbeit ist erkennbar, daß HCV 229-E am engsten mit TGEV und etwas entfernter mit FIPV verwandt ist.

Die von Bradburne (1970) beschriebene Kreuzneutralisation zwischen HCV 229-E und MHV-3, sowie HCV OC-43 muß nach den Ergebnissen der folgenden Literatur als falsch gewertet werden. Schmidt und Kenny (1981, 1982) untersuchten die Antigenverwandtschaft zwischen HCV 229-E und HCV OC-43 mit der zweidimensionalen Immungelelektrophorese und konnten keine antigene Verwandtschaft feststellen. Auch Hierholzer et al., (1972) und Hierholzer (1976) konnten mit Hilfe der doppelten Immundiffusionsreaktion keine Kreuzreaktion beobachten.

Nach heutigem Wissensstand ist HCV 229-E mit TGEV eng und mit FIPV entfernter verwandt.

2.2.3. Gruppe 3

1978 beschrieben Pensaert und Debouck ein Coronavirus-isolat aus Schweinen. Die durch dieses Virus hervorgerufene Erkrankung ist klinisch und pathologisch nicht von der Transmissiblen Gastroenteritis unterscheidbar. Der Erreger, das Epizootische Virusdiarrhoe Virus (EVDV), unterscheidet sich antigenetisch von TGEV (Pensaert und Debouck, 1978; Hess et al., 1980; Witte et al., 1981).

Das EVD-Virus konnte bisher keiner Antigengruppe zugeordnet werden (Pensaert et al., 1981). Wahrscheinlich stellt dieses Coronavirus eine eigene Antigengruppe dar.

2.2.4. Geflügelcoronaviren

Die Coronaviren des Geflügels (IBV, TCV) haben keine gemeinsamen Antigene mit den Coronaviren der Säugetiere.

Über die Antigenverwandtschaften innerhalb der IBV-Gruppe liegen zahlreiche Arbeiten vor, deren Ergebnisse sich jedoch nicht kritisch miteinander vergleichen lassen, da unterschiedliche Testsysteme (Neutralisationstest im Hühnerembryo, in Zellkulturen, Plaquereduktionstest) verwendet wurden.

Cowen und Hitchner (1975) bestimmten die Antigenverwandtschaft zwischen 12 IBV-Stämmen mittels Neutralisationstest in Hühnerembryonen und Plaquereduktionstest. Im Neutralisationstest zeigten sich acht verschiedene Serotypen, während im Plaquereduktionstest nur vier Gruppen beobachtet wurden.

Die antigene Verwandtschaft zwischen 24 IBV-Stämmen untersuchten Darbyshire et al. (1979) mit Hilfe des Neutralisationstestes in embryonalen Hühnertrachealzellkulturen.

Es bildete sich eine Serogruppe mit acht Virusstämmen, die identische Neutralisationswerte aufwiesen und auch untereinander gut kreuzreagierten. Die übrigen 16 Stämme zeigten keine Gemeinsamkeiten im Neutralisationstest.

Mit einer vergleichbaren Methode (Plaquereduktionstest) konnten Waday und Faragher (1981) unter 17 australischen IBV-Isolaten neun Serotypen feststellen. Innerhalb jedes Serotyps kreuzneutralisierten die Immunseren. Zwischen den Serotypen und der Plaquemorphologie bestand keine Korrelation.

Bezüglich ihrer morphologischen Übereinstimmung untersuchten Collins und Alexander (1980a) mit Hilfe der Gelelektrophorese 12 IBV-Isolate, welche sechs bekannten Serotypen angehören. Als Resultat ergaben sich auf Grund des Molekulargewichtes der anteilsgrößten Polypeptide drei Polypeptidmuster (31 K und 86 K für M 41; SE 17; 27 K und 89 K für Iowa und Holle; 27 K und 91 K für Connecticut und den T-Strang).

Ein übereinstimmendes Ergebnis erhielten mit der gleichen Methode Lomniczi und Morser (1981) bei einem Vergleich von 12 IBV-Stämmen, welche sieben bekannten Serotypen angehören. Sie konnten zwei Proteinmuster feststellen.

Berry und Stokes (1968) beschrieben für alle IBV-Stämme ein gemeinsames, präzipitierendes Antigen. Die genaue Zahl der verschiedenen IBV-Serotypen ist bisher noch nicht bekannt.

TCV, das serologisch einheitlich reagiert (Pomeroy et al., 1975) zeigt keine antigene Kreuzreaktion mit IBV oder anderen Coronaviren und bildet deshalb eine eigene Gruppe (Ritchie et al., 1973).

2.3. Vorkommen und Verbreitung der Coronaviren der Gruppe 1

Über das Vorkommen und die Verbreitung von Coronaviren der Gruppe 1 liegen nur für HEV zahlreiche Daten vor, während für BCV und HCV OC-43 nur wenige epidemiologische Untersuchungen veröffentlicht wurden. Über das Vorkommen und die Verbreitung von MHV und RCV liegen bisher keine epidemiologischen Daten vor.

Hämagglutinierendes Encephalomyelitis-Virus (HEV)

Über das Vorkommen von Antikörpern in Schweineseren liegen Studien aus Kanada, USA, England, Japan und Deutschland vor. Girard et al. (1964) untersuchten mit Hilfe der Häm-agglutinationshemmungsreaktion (HAH) Schweineseren aus Betrieben in Kanada, in denen Kümmern und Erbrechen auftrat, und solche, bei denen nie klinische Symptome erkennbar waren. Bei den Problembeständen hatten von 42 Saugferkeln 88% HEV-Antikörper und von 116 älteren Schweinen waren 96% positiv. In den Betrieben, wo die Krankheit noch nie aufgetreten war, waren von 83 Zuchtschweinen 16% und von 211 Schlachtschweinen 31% seropositiv.

Hess und Bachmann (1978) stellten mittels Virusneutralisationstest einen starken Anstieg der HEV-Verbreitung innerhalb von 10 Jahren in Süddeutschland fest. 1968 hatten 9,2% der 167 Schweineseren von Zucht- und Schlachtschweinen neutralisierende Antikörper. 1978 waren bei den Schlachtschweinen (331 Seren) 75% positiv und bei den Zuchtschweinen (81 Seren) 90%. In 112 Seren von neugeborenen, kolostrumfrei aufgezogenen SPF-Ferkeln konnten keine neutralisierende HEV-Antikörper festgestellt werden.

In der Zeitspanne zwischen 1960 und 1969 fanden Cartwright et al. (1970) bei Zucht- und Mastschweinen in Südengland mit der Hämagglutinationshemmungsreaktion 11-49% positiv

reagierende Tiere. 1969 waren von 185 Schweine- und Ferkelseren aus Gebieten mit Krankheitsausbrüchen in England und Wales 82% positiv.

Hirai et al. (1974) konnten mit derselben Methode bei 54% von 6797 untersuchten Schweineseren in Japan HEV-Antikörper nachweisen. Die Hälfte der positiven Seren hatten einen Titer von größer 1:1280. Mit zunehmendem Alter (0-12 Monate) stieg die Rate der HEV positiven Tiere (53-72%). Bei den bis zwei Monate alten Saugferkeln, die gleiche Titer wie die Muttertiere aufwiesen, liegt der Verdacht nahe, daß die Antikörper mit dem Kolostrum übertragen wurden.

In den USA untersuchten Mengeling (1975) mit Hilfe des Neutralisationstestes, der Hämagglutinationshemmungsreaktion und des Agargeldiffusionstestes das Vorkommen von HEV-Antikörpern in Schweineseren. Bei 438 Seren von kolostrumfrei aufgezogenen Neugeborenen waren mit keiner der angewandten Methoden Antikörper nachweisbar. Von den 803 Seren älterer Schweine hatten 578 (72%) HEV-Antikörper im Neutralisationstest und 364 (45,9%) Antikörper in dem Agargeldiffusionstest. 349 Seren wurden mit den drei Methoden vergleichend untersucht. Dabei erwies sich der Neutralisationstest mit 94,4% positiven Proben als empfindlichste Methode, vor der Hämagglutinationshemmungsreaktion mit 89,7% und dem Agargeldiffusionstest mit 51,9%. Die Staaten Maine und New Hampshire-Vermont waren antikörperfrei, die übrigen wiesen zwischen 11 und 97% seropositive Tiere auf.

Schon 1972 hatte Mengeling mit der Hämagglutinationshemmungsreaktion 116 HEV-Antikörperpositive (76%) von 152 Schweineseren aus Iowa gefunden.

Kaye et al. (1977) untersuchten Humanseren von verschiedenen Berufs- und Altersgruppen auf neutralisierende HEV-Antikörper in den USA. Niedrige HEV-Antikörpertiter (2-4%) sind nur bei Berufsgruppen nachweisbar, die häufig Kontakt mit Schweinen haben.

Bovines Coronavirus (BCV)

1978 veröffentlichten Hager und Storz eine epidemiologische Studie über das Vorkommen von BCV-Antikörpern in amerikanischen Milchrinderherden. Mit Hilfe des Agargelpräzipitationstestes konnten sie bei 227 Rindern (aus 15 Herden) von 263 Rindern (19 Herden) BCV-Antikörper nachweisen. Dies entspricht einem Verseuchungsgrad von 86%.

Über die Verbreitung von BCV-Antikörpern in menschlichen Seren berichteten Storz und Rott (1981). Mittels Neutralisations- und Agargelpräzipitationstest fanden sie bei 100 Blutbank- und 36 Klinikserumproben aus Deutschland 7 bzw. 25% Antikörperträger. Von den aus den USA stammenden 26 Studenten- und 8 Laborantenserumproben waren acht bzw. vier seropositiv. Alle im Agargeldiffusionstest positiven Seren waren auch im Neutralisationstest positiv, während umgekehrt von 40 im Agargeldiffusionstest negativen Seren 19 im Neutralisationstest positiv waren. Diese Erkenntnis läßt darauf schließen, daß der von Hager und Storz (1978) mittels Agargeldiffusionstest beschriebene Verseuchungsgrad mit BCV unter den amerikanischen Milchrindern wahrscheinlich höher ist.

Sato et al. (1981) erweiterten das Probandenspektrum und untersuchten mit Hilfe des Neutralisationstestes 306 Serumproben von 12 verschiedenen Spezies aus Japan. Die Serumproben wurden über einen Zeitraum von zwei Jahren gesammelt. Seren von Mensch, Rind und Ratte waren 100%, die von Schwein, Schaf und Pferd zwischen 75-90% seropositiv. Ein geringes Vorkommen von BCV-Antikörpern wiesen die kleinen Nager (Maus, Meerschweinchen, Kaninchen) mit 22-45% positiven Seren auf. Bei Hamster, Ziege und Huhn waren keine Antikörper nachweisbar. Hohe Antikörpertiter hatten Rind, Schwein und Ratte. Bereits 1980 konnten Sato et al. vergleichbar hohe Antikörpertiter mittels Hämagglutinationshemmungsreaktion bei Rind und Schwein bestimmen.

Ähnliche Ergebnisse fand Lu (1985) mit Hilfe des Neutralisationstestes in Deutschland. BCV-Antikörper kommen im Serum von Mensch (93%) und Rind (97%), nicht aber bei Ziegen (0%) vor. Bei den Pferde- und Schweineseren waren im Gegensatz zu Sato et al. (1981) nur 55 bzw. 44% Antikörperträger nachweisbar. Von den 145 untersuchten Hundeseren waren 46% seropositiv.

Diese Resultate deuten auf eine weite Streuung von BCV bei verschiedenen Spezies in Japan und Deutschland hin, können aber auch für eine nahe Antigenverwandtschaft der Coronaviren der seropositiven Tierarten sprechen.

Humanes Coronavirus OC-43 (HCV OC-43)

1975 zeigten Sarateanu und Ehrengut in einer Studie die Verbreitung von HCV OC-43-Antikörpern unter der Hamburger Bevölkerung auf. Zum Nachweis der Coronavirusantikörper wählten sie die Hämagglutinationshemmungsmethode. Mit 52,8% Antikörperträgern zeigte die Altersgruppe von 15-24 Jahre die weiteste Verbreitung von HCV OC-43, gefolgt von den 0-14jährigen mit 36,2%. Bei den restlichen Altersgruppen (12-17 Jahre 6,8%, 25-59 Jahre 14,4% und über 60 Jahre 16,8% positive) konnten wesentlich weniger Antikörperträger festgestellt werden.

Bereits vorher publizierten McIntosh et al. (1974) und Kaye et al. (1970, 1971) Ergebnisse über die Verbreitung von HCV OC-43 in den USA. Mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion fanden McIntosh et al. (1974) bei 47% der Kinderseren zwischen fünf und sechs Jahren Antikörper gegen HCV OC-43. Kaye et al. (1970, 1971) stellten bei 36% der Kinder eine Serokonversion fest.

In einer erweiterten Studie untersuchten Kaye et al. (1977) in den USA humane Seren von verschiedenen Alters- und Be-

rufsgruppen mit Hilfe der Hämagglutinationshemmungs-, Komplementbindungsreaktion und des Neutralisationstestes auf das Vorkommen von HCV OC-43-Antikörper. Von den 1416 untersuchten Seren waren im Durchschnitt 27% positiv. Den niedrigsten Prozentsatz von HCV OC-43-Antikörperträgern hatten Fleischpacker (14%), den höchsten Hochschulstudenten (67%). Eine Abhängigkeit des Antikörpertiters vom Alter oder Beruf war nicht erkennbar. Dieses Ergebnis läßt auf eine relativ breite Streuung von HCV OC-43 in der amerikanischen Bevölkerung schließen.

Für Finnland führten Hovi et al. (1979) eine epidemiologische Studie mit Hilfe der Komplementbindungs-, Hämagglutinationshemmungsreaktion und Radio-Immuno-Assay durch. Sie fanden bei Kindern bis 23 Monate keine Antikörper, danach stieg die Prozentzahl der Antikörperträger rasch an und ab dem 6. Lebensjahr hatten alle untersuchten Seren HCV OC-43-Antikörper. Die Ergebnisse stimmten bei allen drei Methoden überein.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Virusmaterial

Die Vermehrung des bei Hess und Bachmann (1978) als Testvirus beschriebenen Stammes 67-N des Hämagglutinierenden Encephalomyelitis-Virus (HEV 67-N) erfolgte über fünf Passagen in sekundären Schilddrüsenzellkulturen (ST). Nach Gefriertauen und anschließender Zentrifugation (15 min, bei 8000 g) wurde der Überstand in je 1 ml Mengen bei -70°C aufbewahrt. Dieses Material diente als Testvirus für alle serologischen Untersuchungen mit HEV.

Der Mäusehepatitisvirus Stamm A-59 (MHV A-59)* wurde über sechs Passagen in einer Delayed Brain Tumor-Zelllinie (DBT) vermehrt. Die Gewinnung des Testvirusmaterials erfolgte in der für HEV beschriebenen Weise.

Es wurde versucht, das humane Coronavirus OC-43** über jeweils sechs Passagen in der Affennierenzelllinie BSC-1 und der humanen Rektaltumor-Zelllinie-18 (HRT-18) zu vermehren. Weiterhin wurde versucht HCV OC-43 aus einem mit HCV OC-43 infizierten Mäusehirn auf die gleichen Zelllinien über sechs Passagen zu adaptieren.

3.1.2. Serumproben

Alle Serumproben wurden vor ihrer Verwendung 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. Die Anzahl und Herkunft der Seren von den untersuchten Spezies ist in Tabelle 5 zusammengestellt.

* Dr. Wege, Würzburg, danken wir für die Überlassung des Virus-Stammes.

** Dr. Tyrrell, Harrow, Middlesex, danken wir für die Überlassung des HCV OC-43 und der Mäusehirnsuspension.

Tabelle 5: Überblick über Spezies, Anzahl und Herkunft der untersuchten Seren.

Spezies	Anzahl der untersuchten Seren	Herkunft/Bestände
Rind	193	103 Bestände
Schaf	204	31 "
Ziege	96	16 "
Pferd	138	86 "
Schwein	194	wurden an vier verschiedenen Schlacht- tagen am Städtischen Schlachthof München entnommen
Hund	98	stammen aus einer Hundeschule, die Blutproben wurden bei Einstellung der Tiere entnommen.
Kaninchen	41	Seren stammen aus mehreren Instituten
Mensch	191	99 Seren aus Kempten, 92 Seren aus München

3.1.3. Zellkulturen

Schilddrüsen aus dem normalen Schlachtbetrieb des Schlachthofs München dienten zur Herstellung von Schilddrüsenzellkulturen. Der Transport erfolgte in PBS (Phosphate Buffered Saline), dem 500 IE/ml Penicillin, 500 µg/ml Streptomycin, 500 µg/ml Neomycin und 12 µg/ml Amphotericin B zugefügt war. Nach der Entfernung der Kapsel wurden die Schilddrüsen zur Oberflächensterilisation je zweimal in 95%igem Alkohol getaucht und abgeflammt. Danach erfolgte die manuelle Zerkleinerung der Organe in Stückchen von ca. 1-2 mm Kantlänge. Die so hergestellte Gewebesuspension wurde dreimal in PBS gewaschen. Hellrote, weiche Organe, die sich leicht zerschneiden ließen, ergaben die größte Zellausbeute (Liebermann und Vetterlein, 1970).

Die Gewebestückchen wurden in einer 0,25%igen Trypsin-PBS-Lösung (ohne Ca^{++} und Mg^{++}) fraktioniert und bei 37°C trypsiniert. Nach dem Verwerfen der ersten Fraktion (nach ca. 1 Stunde Trypsinierungszeit) erfolgte die Abnahme der folgenden 3-4 Fraktionen nach jeweils $1\frac{1}{2}$ Stunden, die Filtration der Zell-Trypsin-Suspension durch einen 6 fachen Mullfilter und die Lagerung der Fraktionen bei 4°C. Nach Beendigung des Gewebeaufschlusses wurde die Zell-Trypsin-Suspension 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert, die Überstände verworfen, das Sediment in PBS suspendiert und erneut zentrifugiert. Das gewonnene Zellsediment wurde in 10 ml Medium (EMEM mit 10% FKS und 10% Laktalbuminhydrolysat) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Trypanblau). Für die Anzucht wurden 500 000 Zellen/ml Medium verwandt. Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. In der Regel waren die primären ST-Kulturen nach 4-6 Tagen zu einem Zellrasen ausgewachsen. Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach einmaligem Waschen (PBS) mit einer Saline-Trypsin-Versen-Lösung (STV = 0,06% Trypsin, 0,002% Versen) von der Glasunterlage abgelöst, anschließend zentrifugiert (3 min. bei 500 g), in Medium aufgenommen und mit einer Teilungsrate von 1:2 in die Zuchtgefäße eingesät.

MHV A-59 wurde in der Delayed Brain Tumor-Zelllinie (DBT)* (Kumaniski, 1967; Hirano et al., 1974) vermehrt. Die Zellen wurden alle drei Tage mit einer Teilungsrate von 1:3 passiert. Die Infektion dicht gewachsener Rouxflaschen erfolgte mit je 5 ml Virussuspension ($10^{6,5}$ KID₅₀/ml).

Für die Vermehrung und Anzüchtung des HCV OC-43 wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet.

Nach Angaben von Macnaughton (persönliche Mitteilung) kann das HCV OC-43 auf humanen Rektaltumorzellen-18 (HRT-18) gezüchtet werden. Die Zellen wurden alle drei Tage mit einer Teilungsrate von 1:2 passiert. Die Infektion dicht gewachsener Zellkulturröhrchen erfolgte mit 0,2 ml Virus- bzw. Mäusehirnsuspension.

Schmidt und Kenny (1981) beschrieben die Züchtung von HCV OC-43 in der Affennierenzelllinie BSC-1. Diese Zellen wurden alle drei Tage mit einer Teilungsrate von 1:3 subkultiviert. Die Infektion der dicht gewachsenen Zellkulturröhrchen erfolgte wie bei den HRT-18-Zellen.

3.1.4. Medien

Für die Züchtung der ST-Zellkulturen, der DBT-Zellen, sowie der BSC-1-Zellen diente Minimal Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzlösung (Earle, 1934).

Die HRT-18-Zellen wurden mit RPMI gezüchtet.

Die Anreicherung der Medien erfolgte mit fötalem Kälberserum (FKS), die Anzuchtmedien enthielten 10%, außer RPMI mit 15%, Erhaltungsmedien 5% FKS. Ferner wurden dem ST-Zellanzuchtmedium Laktalbuminhydrolysat, 50 ml/l einer 5%igen Stammlösung, dem Erhaltungsmedium 25 ml/l zugesetzt.

* Für die Überlassung der DBT-Zelllinie danken wir Dr. Wege, Würzburg.

Da der normale Schlachtbetrieb eine sterile Entnahme der Schilddrüsen nicht ermöglichte, erfolgte die Zugabe folgender Antibiotika-Konzentrationen ins Medium (in IE/ml bzw. µg/ml).

	Penicillin	Streptomycin	Neomycin	Amphotericin
ST-Anzuchtmedium	200	200	200	4
ST-Erhaltungsmedium	100	100	50	2
DBT-Zelllinie	50	50	-	-
BSC-1-Zelllinie	50	50	-	-
HRT-18-Zelllinie	50	50	100	2

3.1.5. Nachweis der HCV OC-43 Vermehrung durch Hämadsorption

Die von Vogel und Shelokov (1957) beschriebene Methode der Hämadsorption wurde angewandt, da HCV OC-43 auf keiner der zwei verwendeten Zelllinien einen deutlichen cytopathischen Effekt produzierte.

Bei dieser Methode tritt die Hämadsorption ein, wenn Erythrozyten von Meerschweinchen oder Hühnern zu den HCV OC-43 infizierten Zellkulturen gegeben werden. Die Erythrozyten adsorbieren an der Oberfläche der infizierten Zellen und haften fest. Das im Viruspartikel enthaltene Häm-agglutinin wird durch die Hämadsorption nachgewiesen.

Den mit HCV OC-43 infizierten Zellkulturen wurde nach 3-9 tägiger Inkubation das Medium abgesaugt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von 1 ml einer 0,2%igen Hühner- bzw. Meerschweinchenerythrozytensuspension pro Röhrchen. Anschließend wurden die Erythrozyten einmal

mit PBS abgewaschen. Im positiven Fall sind bei mikroskopischer Auswertung kleine Inseln von Erythrozyten auf dem Zellrasen zu beobachten.

3.1.6. Virustitrierung

HEV und MHV A-59 wurden parallel in Mikrotitrationsplatten (M 123 A, Flow Laboratories, Bonn) und in Zellkulturröhrchen titriert.

Im Röhrchentest wurden sekundäre ST-Zellen für HEV und DBT-Zellen für MHV A-59 verwendet. Die Verdünnung des Virusmaterials erfolgte in 10er Potenzen, die auf je vier Zellkulturröhrchen pro Verdünnungsstufe (0,2 ml Virusverdünnung) verimpft wurden. Nach einer Virusadsorptionszeit von einer Stunde bei 37°C wurde 1,3 ml Erhaltungsmedium zugegeben. Die Endablesung erfolgte für HEV am 7. Tag, für MHV A-59 am 6. Tag p. inf. auf Grund des cytopathischen Effektes (cpE).

Die Mikrotitration wurde ebenfalls in 10er Potenzen (90 µl EMEM, 10 µl Virusverdünnung) durchgeführt. Nach dem Anlegen der Verdünnungsreihen wurde 0,1 ml Zellsuspension (ca. 10^5 Zellen) pro Loch zugegeben (12 Löcher/Verdünnungsstufe). Die Endablesung erfolgte wie beim Röhrchentest. Die Berechnung des Infektiositätstiters erfolgte bei beiden Methoden gemäß dem von Spearman (1908) und Kärber (1931) angegebenen Verfahren.

3.1.7. Neutralisationstest (NT)

Die Bestimmung der HEV- und MHV A-59-Antikörper in Serumproben von Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein, Hund, Kaninchen und Mensch erfolgte im Mikroneutralisationstest

(Platten: M 123 A Flow Laboratories, Bonn). Für jede Serumverdünnung wurden drei Nöpfchen verwendet. Die jeweils eingesetzte Virusmenge betrug für beide Viren konstant etwa $100 \text{ KID}_{50}/0,05 \text{ ml}$.

Nach Vorlage von 0,05 ml Medium wurden von jeder Serumprobe drei Verdünnungsreihen in log 2-Schritten hergestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,05 ml der Virusgebrauchsverdünnung. Bei jeder Versuchsreihe wurde eine Viruskontrolle mitgeführt. Die Bindungszeit der Antigen-Antikörpergemische betrug bei HEV 120 Minuten bei 4°C und bei MHV A-59 60 Minuten bei 37°C. Danach kam 0,1 ml Zellsuspension (ca. 10^5 Zellen) in jedes Loch.

Die Ablesung des cpE der HEV-Teste erfolgte nach 6 Tagen Inkubation bei 37°C, die der MHV A-59 nach 5 Tagen. Als Titer wurde die höchste Serumverdünnung abgelesen, bei der mindestens zwei Vertiefungen keine Virusvermehrung zeigten.

3.1.8. Reinigung von HEV 67-N und MHV A-59

Die bei -70°C eingefrorene Virus-Zellsuspension wurde aufgetaut und 30 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Sedimentation des im Überstand enthaltenen Virus 90 Minuten bei 27000 rpm in einem Beckman SW Rotor. Das Sediment wurde in einer kleinen Menge TEN-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,35, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und über einen linearen 20-60% (wt/wt) Saccharosegradienten in TEN-Puffer drei Stunden bei 30000 rpm in einem Beckman SW 56-Rotor isopyknisch zentrifugiert. Die Virusbande wurde bei ca. 38% (wt/wt) Saccharose seitlich entnommen, 1:10 mit TEN-Puffer verdünnt und 60 Minuten bei 40000 rpm in einem Beckman SW-60 Rotor sedimentiert, anschließend in 0,5 ml TEN-Puffer resuspendiert und bei -70°C aufbewahrt. Die Herstellung der Saccharoselösung erfolgte mit TEN-Puffer, die Durchführung der Arbeitsschritte bei 4°C.

3.1.9. Herstellung von Immunseren

Drei ca. 400 g schwere Meerschweinchen dienten zur Herstellung von Immunseren gegen MHV A-59, HEV 67-N und BCV München 270/83. Die gereinigten und konzentrierten Coronaviren wurden 1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt und intracutan an mehreren Stellen verteilt injiziert. Sechs Wochen später boosterte man die Tiere mit einem 1:1 Gemisch aus Virus und inkomplettem Freund'schen Adjuvans s.c.. Drei Wochen nach der Boosterung wurden die Immunseren durch Ausbluten der Tiere gewonnen. Die Bestimmung der Antikörpertiter erfolgte im Neutralisationstest.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Seroepidemiologische Untersuchung

Insgesamt wurden 1155 Seren von Rind, Schaf, Ziege, Schwein, Pferd, Hund, Kaninchen und vom Menschen auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Hämagglutinierende Encephalomyelitis-Virus (HEV) des Schweines und das Mäuse-Hepatitis-Virus A-59 (MHV) im Neutralisationstest untersucht.

Vorkommen von Antikörpern gegen HEV 67-N

Die meisten positiven Reagenten gegen das Hämagglutinierende Encephalomyelitis-Virus wurden beim Rind und beim Schwein - dem natürlichen Wirt für HEV - gefunden. Deutlich weniger Reagenten liessen sich bei Ziege, Kaninchen und Schaf nachweisen. Bei Pferd und Hund reagierten nur Einzelseren, während alle 193 getesteten menschlichen Seren keine neutralisierenden Antikörper gegen HEV aufwiesen.

Von 193 untersuchten Rinderseren waren 147 (76,17%) positiv mit Titern zwischen 1:4 und $\geq$ 1:256. Die Zahl der Tiere mit hohen Antikörpertitern ($>1:16$) war jedoch gering. 28 Tiere hatten Titer von 1:32, 13 Tiere einen Titer von 1:64, fünf Tiere Titer von 1:128 und nur zwei Tiere Titer von $\geq$ 1:256. 99 Tiere wiesen Antikörpertiter von $\leq$ 1:16 auf.

Beim Schwein, das der natürliche Wirt für HEV ist, waren 125 (64,43%) von 194 Seren antikörperpositiv. Hier war jedoch die Zahl der Tiere mit hohen Antikörpertitern im Verhältnis höher. Von 125 positiven Seren wiesen 78 Titer auf, die $>1:16$ waren.

Beim Schaf wiesen zwar 45 (22.06%) von 204 untersuchten Seren HEV-Antikörper auf, jedoch waren die Titer generell sehr niedrig. 44 Seren hatten Titer von $\leq 1:16$, davon allein 38 Seren mit Titern zwischen 1:4 und 1:8. Nur ein Serum hatte einen Antikörpertiter von 1:64. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Ziegenseren erzielt. Obwohl 38 von 96 Serumproben (39,6%) positiv reagierten, waren die Titer niedrig. 35 Seren lagen im Titerbereich zwischen 1:4 und 1:8, drei Seren wiesen Titer von 1:16 auf.

Die Kaninchenseren reagierten ebenfalls mit niedrigen Titern. Insgesamt standen nur 41 Seren zur Verfügung. Von den 11 positiven Proben (26,83%) hatten sechs einen Titer von 1:4, drei von 1:8 und zwei von 1:16.

Relativ hohe Antikörpertiter wurden beim Pferd festgestellt, obwohl nur 12 von 126 Seren (8,7%) reagierten. Die Titerverteilung war sehr gleichmäßig zwischen 1:4 und 1:64 mit jeweils zwei bzw. drei Seren, im Gegensatz zum Hund, wo von neun positiven Serumproben (von insgesamt 98 untersuchten) sieben im Titerbereich zwischen 1:4 und 1:8 lagen. Nur zwei Seren hatten Titer von 1:64.

Die Ergebnisse des Vorkommens von Antikörpern gegen HEV bei verschiedenen Spezies sind in Tabelle 6, die prozentuale Verteilung zwischen positiven und negativen Proben in Abbildung 5 dargestellt.

Vorkommen von Antikörpern gegen MHV A-59

Das höchste Vorkommen von Antikörpern gegen das Mäuse-Hepatitis-Virus A-59 wurde beim Rind festgestellt. Darüberhinaus ließen sich Antikörper nur noch bei Pferden und beim Menschen nachweisen. Bei Schweine-, Schaf-, Hunde- und Kaninchenserum waren jeweils nur einzelne Seren mit Antikörpern gegen MHV zu finden. Die untersuchten Ziegenseren waren ausnahmslos negativ.

Tabelle 6: Ergebnisse der Untersuchung von Seren verschiedener Spezies auf neutralisierende Antikörper gegen das Hämagglutinierende Encephalomyelitis-Virus, Stamm 67-N.

Spezies	Rind	Schaf	Ziege	Schwein	Pferd	Hund	Kaninchen	Mensch
Anzahl d. Serumproben	193	204	96	194	138	98	41	191
positiv	147 (76,17%)	45 (22,06%)	38 (39,58%)	125 (64,43%)	12 (8,7%)	9 (9,18%)	11 (26,83%)	-
negativ	46 (23,83%)	159 (77,94%)	58 (60,42%)	69 (35,57%)	126 (91,3%)	89 (90,82%)	30 (73,17%)	191 (100%)
Titer								
≥ 1:256	2	-	-	12	-	-	-	-
1:128	5	-	-	24	-	-	-	-
1:64	13	1	-	28	2	2	-	-
1:32	28	-	-	14	2	-	-	-
1:16	29	6	3	15	3	-	2	-
1:8	26	20	9	15	2	2	3	-
1:4	44	18	26	17	3	5	6	-
< 1:4	46	159	58	69	126	89	30	191

geometr. Titermittel- 1:13,436 1:6,964 1:5,258 1:33,088 1:14,254 1:8,64 1:6,217 -
wert

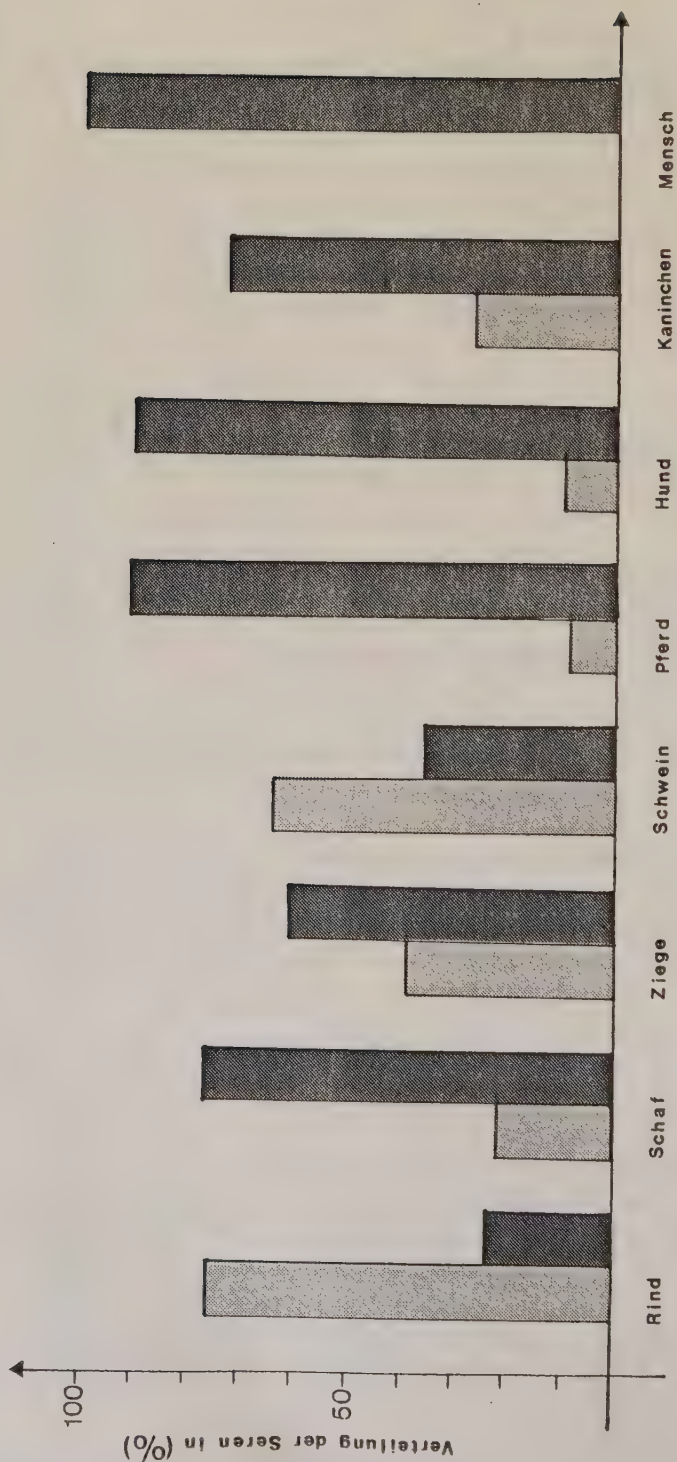


Abb. 5: Prozentuale Verteilung antikörperpositiver und -negativer Seren mit dem Hämagglutininierenden Encephalomyelitis-Virus Stamm 67-N bei verschiedenen Spezies.

Beim Rind waren 124 von 193 untersuchten Seren positiv (64,25%). Jedoch waren die Titer ausnahmslos niedrig. Nur 14 der positiven Seren wiesen Antikörpertiter auf, die $>1:16$ waren. Zehn Seren hatten Titer von $1:32$, bei vier Seren betrug der Antikörpertiter $1:64$.

Auch beim Pferd waren die Antikörpertiter niedrig. Von den 15 Seren, die von 138 untersuchten Proben Antikörpertiter aufwiesen (10,87%), lagen 11 Seren im Titerbereich zwischen $1:4$ und $1:8$, zwei Seren hatten Titer von $1:16$ und zwei Seren $1:32$.

Vergleichbare Ergebnisse konnten mit den Serumproben vom Menschen erzielt werden. 10,47% (20) der untersuchten 191 Proben wiesen Antikörper gegen MHV auf, davon allein 13 mit einem Titer von $1:4$. Nur ein Serum hatte einen Titer von $1:16$. Höhere Titer wurden in keiner der Serumproben nachgewiesen.

Beim Schaf waren nur drei von 294 Serumproben positiv (1,47%), jeweils ein Serum mit Titern von $1:4$, $1:8$ und $1:16$.

Sieben von 194 untersuchten Schweineseren (3,61%) hatten Antikörper gegen MHV, ausnahmslos im Titerbereich zwischen $1:4$ und $1:8$.

Beim Hund reagierten vier von 98 Seren (4,08%), beim Kaninchen zwei von 41 Proben (4,88%). Die Titer waren niedrig.

Die Ergebnisse des Vorkommens von Antikörpern gegen MHV A-59 bei verschiedenen Spezies sind in Tabelle 7, die prozentuale Verteilung zwischen positiven und negativen Proben in Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Untersuchung von Seren verschiedener Spezies auf neutralisierende Antikörper gegen das Mause-Hepatitis-Virus, Stamm A-59.

Spezies	Rind	Schaf	Ziege	Schwein	Pferd	Hund	Kaninchen	Mensch
Anzahl d. Serumproben	193	204	96	194	138	98	41	191
positiv	124 (64,25%)	3 (1,47%)	-	7 (3,61%)	15 (10,87%)	4 (4,08%)	2 (4,88%)	20 (10,47%)
negativ	69 (35,75%)	201 (98,53%)	96 (100%)	187 (96,39%)	123 (89,13%)	94 (95,92%)	39 (95,12%)	171 (89,53%)
Titer								
≥ 1:256	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	4	-	-	-	-	-	-	-
1:32	10	-	-	-	2	-	-	-
1:16	11	1	-	-	2	1	-	1
1:8	33	1	-	1	4	-	2	6
1:4	66	1	-	6	7	3	-	13
< 1:4	69	201	96	187	123	94	39	171

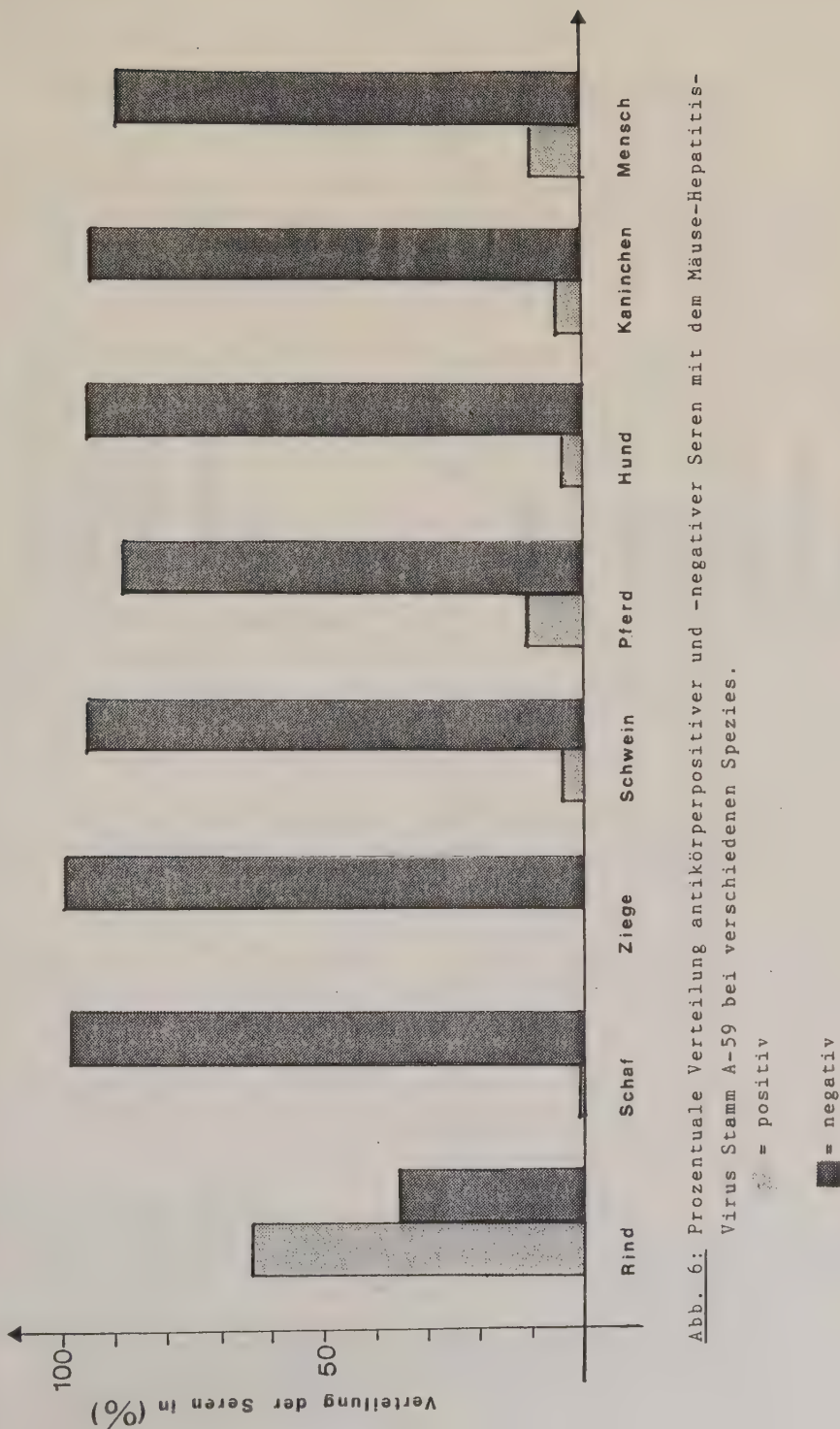


Abb. 6: Prozentuale Verteilung antikörperpositiver und -negativer Seren mit dem Mäuse-Hepatitis-Virus Stamm A-59 bei verschiedenen Spezies.

Vergleich zwischen Vorkommen von Antikörpern gegen HEV und MHV A-59 bei verschiedenen Spezies

Beim Rind wiesen 76,17% der untersuchten Seren Antikörper gegen HEV und 64,25% Antikörper gegen MHV auf. Die geometrischen Titermittelwerte lagen bei HEV bei 1:13,436 und bei MHV bei 1:7,034.

Schweineseren hatten zu 64,43% Antikörper gegen HEV mit einem geometrischen Titermittel von 1:33,088, gegenüber MHV reagierten jedoch nur 3,61% mit einem geometrischen Titermittelwert von 1:4,416.

Bei Schafen betrug der Anteil der positiven Seren gegen HEV 22,06%, gegen MHV 1,47%. Die entsprechenden geometrischen Titermittelwerte lagen bei 1:6,964 bzw. 1:8.

Beim Pferd war der Anteil der Reagenten gegenüber HEV und MHV annähernd gleich. HEV wurde von 8,7% der untersuchten Seren neutralisiert, MHV von 10,87%. Die Titermittelwerte betrugen für HEV 1:14,254 und für MHV 1:7,638.

Bei 9,18% Hundeseren lagen Antikörper gegen HEV vor (Titermittelwerte 1:8,64) und bei 4,08% gegen MHV (Titermittelwert 1:5,656).

Beim Kaninchen reagierten 26,83% antikörperpositiv gegen HEV, mit Titermittelwerten von 1:6,217 und 4,88% gegen MHV mit Titermittelwerten von 1:8.

Menschliche Seren waren negativ in der Untersuchung auf HEV-Antikörper und nur 10,47% neutralisierten MHV (Titermittelwert 1:5,278).

Die Vergleichswerte der neutralisierenden Antikörpertiter gegenüber HEV und MHV bei verschiedenen Spezies sind in Abbildung 7 in einer graphischen Darstellung gegenübergestellt worden.

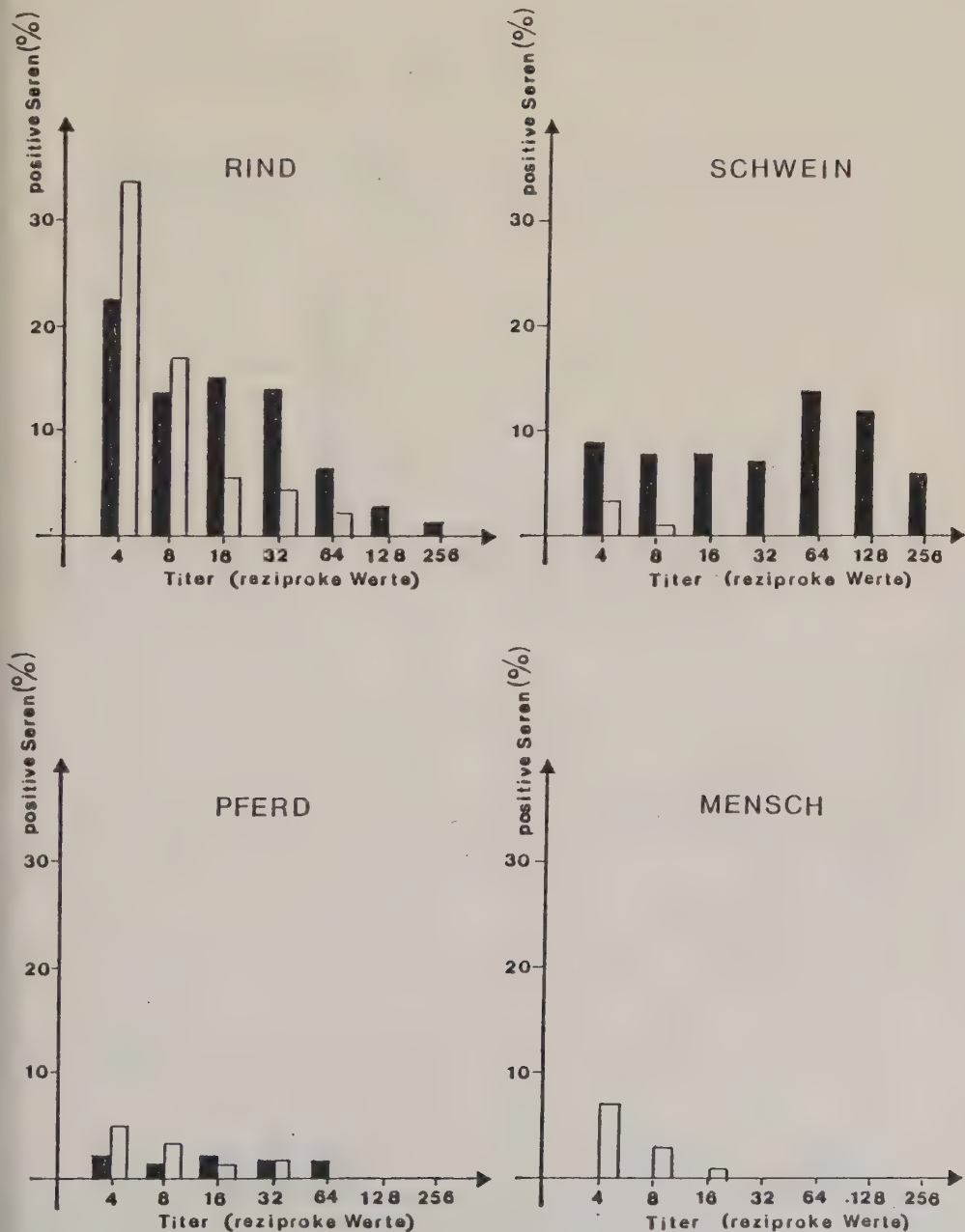


Abb. 7: Neutralisationstiter gegen MHV A-59 und HEV 67-N bei den untersuchten Spezies. Die Prozentangaben der positiven Seren beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweils getesteten Serenproben.

■ = HEV 67-N, □ = MHV A-59

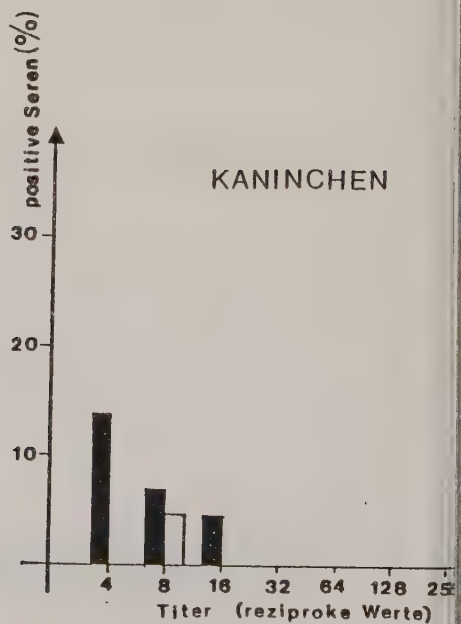
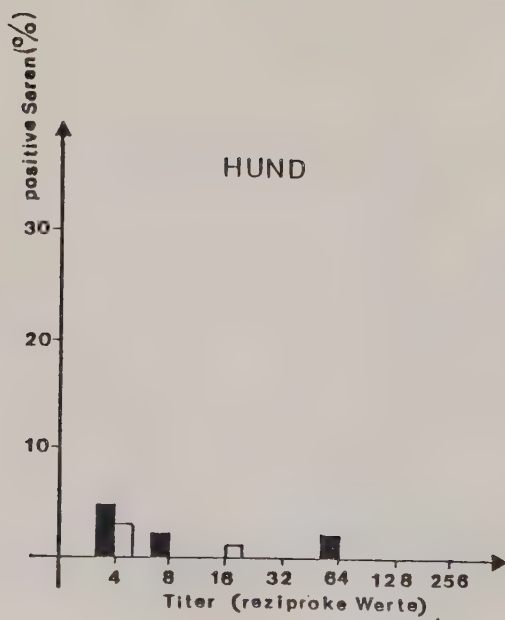
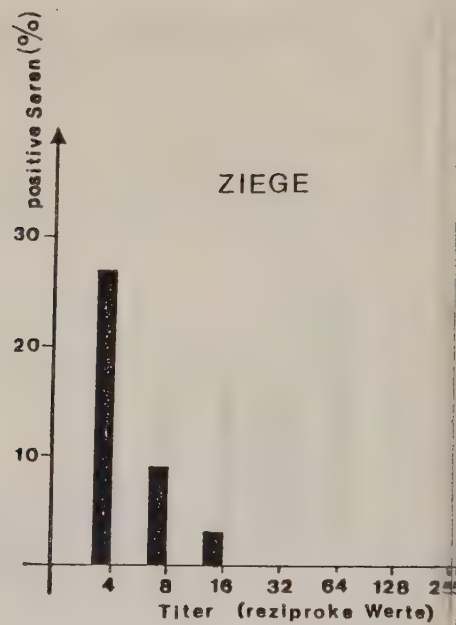
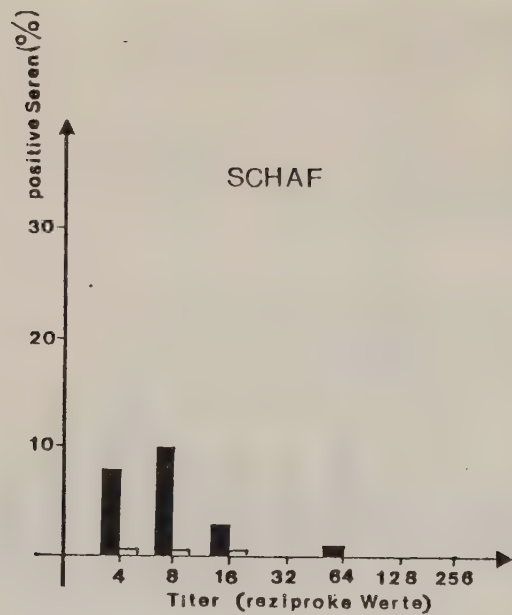


Abb. 7: Fortsetzung

■ = HEV 67-N,

□ = MHV A-59

3.2.2. Versuche zur Züchtung des humanen Coronavirusstammes OC-43 in Zellkulturen

Für die Züchtung des HCV-Stammes OC-43 wurden HRT-18- und BSC-1-Zellen herangezogen. Die Inokulation erfolgte mit Hilfe der Absorptionsmethode, die Bebrütung bei 37°C. Der Virusnachweis erfolgte jeweils mit der Hämadsorptionsmethode (Had-Reaktion).

Eine positive Had-Reaktion konnte bei verschiedenen Anzüchtungsversuchen jeweils immer in der 1. Passage, in der 2. Passage und teilweise auch in der 3. Passage in HRT-Zellen nachgewiesen werden. Von der 3. Passage an zeigte keine der infizierten Kulturen mehr eine Hämadsorption. Die Passagen wurden jeweils bis zur 6. Passage geführt. Die Ergebnisse der Anzüchtungsversuche von OC-43 müssen daher als negativ angesehen werden.

3.2.3. Neutralisationstest mit Immunseren

Die Immunseren gegen MHV A-59, HEV 67-N und BCV München 270/83 wurden wie beschrieben bei 56°C inaktiviert und dann in der entsprechenden Zellkultur (MHV in der DBT-Zelllinie, HEV in sekundären Schweine-Schilddrüsenzellkulturen und BCV in sekundären fötalen bovinen Lungenzellkulturen) einem Kreuzneutralisationstest (100-KID₅₀/Test) unterworfen. Die Ergebnisse, die in Tabelle 8 zusammengestellt sind, zeigen, daß zwischen den einzelnen Antikörpern nur eine geringe Kreuzneutralisation eintritt. Während die homologen Antikörpertiter zwischen 1:512 und 1:1024 schwanken, liegen die heterologen Titer zwischen < 1:2 und 1:8.

Tabelle 8: Ergebnisse der Kreuzneutralisation mit Immunsereen gegen HEV 67-N, MHV A-59 und BCV München 270/83.

Virus	Immunsereen gegen		
	HEV 67-N	MHV A-59	BCV-München 270/83
HEV 67-N	<u>1:512</u>	1:4	n. u. *
MHV A-59	1:8	<u>1:1024</u>	n. u. *
BCV-München 270/83	1:4	<1:2	<u>1:1024</u>

* n. u. = nicht untersucht

4. Besprechung der Ergebnisse

Bisher sind Ergebnisse über das Vorkommen von Antikörpern gegen HEV beim Schwein nur aus Kanada, Süddeutschland, Südengland, Japan und USA (Girard et al., 1964; Cartwright et al., 1970; Mengeling 1972, 1975; Hirai et al., 1974; Hess und Bachmann, 1978) bekannt. Als Einzige untersuchten Kaye et al. (1977) das Vorkommen von HEV neutralisierenden Antikörpern in Humanseren.

Darüberhinaus wird in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen, daß neben dem Schwein, Rinder, Schafe, Ziegen, Pferde, Hunde und Kaninchen Antikörper gegen HEV haben.

Der HEV-Verseuchungsgrad bei den Schweinen entspricht etwa den vor sechs Jahren ermittelten Werte von Hess und Bachmann (1978). Während die Autoren einen starken Anstieg der HEV-Verbreitung von 1968-1978 feststellten, weisen die vorliegenden Ergebnisse auf einen leichten Rückgang (um ca. 10%) des HEV-Vorkommens in der Schlachtschweinpopulation hin. Die Resultate beider Arbeiten sind direkt vergleichbar, da dieselbe Methode angewandt wurde.

Der ermittelte HEV-Verseuchungsgrad bei Schlachtschweinen in Süddeutschland liegt ca. 10-20% über den Werten aus Japan und Südengland (Cartwright et al., 1970; Hirai et al., 1974), jedoch um ca. 30% unter den der USA (Mengeling et al., 1975). Die prozentuale Verbreitung die für Japan und Südengland mit Hilfe der Hämagglutinationshemmungsreaktion ermittelt wurden müssen jedoch etwas höher eingeschätzt werden, da diese Methode unempfindlicher als der Neutralisationstest ist (Mengeling et al., 1975).

Überraschend ist das hohe Vorkommen (76%) von Antikörpern gegen HEV in Rinderseren, da heute, auf Grund der Spezialisierung in den landwirtschaftlichen Betrieben, sehr selten Rinder und Schweine noch gemeinsam gehalten werden.

Ferner reagiert ein relativ hoher Prozentsatz der untersuchten Ziegenserum mit HEV, während bei Schaf, Pferd, Hund und Kaninchen nur wenig Antikörperträger ermittelt werden konnten.

Alle untersuchten menschlichen Seren waren negativ. Dies stimmt mit den von Kaye et al. (1977) ermittelten Daten überein. Die Autoren konnten nur bei Berufsgruppen, die häufig Kontakt mit Schweinen haben, einen geringen Verbreitungsgrad (2-4%) ermitteln.

Da in der Literatur (Sharpee, 1976; Kaye et al., 1977; Pederson et al., 1978) eine Antigenverwandtschaft zwischen HEV und MHV beschrieben ist, wurden die Seren auch auf das Vorkommen neutralisierender Antikörper gegen MHV untersucht.

Ein hoher Prozentsatz von Antikörperträgern (64%) wurde für MHV innerhalb der Rinderpopulation nachgewiesen, so daß dieselben Seren Antikörper sowohl gegen HEV als auch MHV haben. Eine direkte Korrelation ist jedoch nicht erkennbar.

Im Gegensatz zu HEV ist das Vorkommen von Antikörpern gegen MHV bei Schweinen mit 3.6% sehr minimal. Ähnliche Verhältnisse zeigten sich bei Schaf, Ziege und Kaninchen. 10% der menschlichen Seren wiesen Antikörper gegen MHV auf.

Der hohe Prozentsatz von im Neutralisationstest antikörperpositiven Seren beim Rind gegen HEV und MHV sowie bei Ziegen gegen HEV und Schafen gegen HEV ist überraschend und nur schwierig zu deuten. Drei Möglichkeiten müssen hierbei diskutiert werden:

1. Ist das Vorkommen dieser Antikörper auf eine Infektion der Spezies mit den heterologen Erregern HEV und MHV zurückzuführen?
2. Sind diese Antikörper gegen gemeinsam vorkommende Antigene bei HEV und MHV mit dem bovinen Coronavirus und dem menschlichen OC-43 Coronavirus gerichtet?

3. Sind die Antikörper das Ergebnis einer Infektion mit einem homologen, bisher unbekannten Coronavirus bei den einzelnen Spezies, das eine enge Antigenverwandtschaft mit HEV und MHV aufweist?

Bei den Rindern die mit HEV 67-N reagierten ist der geometrische Titermittelwert 1:13 ähnlich wie beim Pferd mit 1:14 gegenüber dem Schwein als homologem Wirt mit 1:33 relativ hoch. Bei Schafseren liegt der Titermittelwert bei etwa 1:7. Die niedrigeren Titer können dafür sprechen, daß es sich beim Rind um eine Reaktion von HEV mit Antikörpern von BCV handelt, da in den gleichen Seren 93,4% Antikörper gegen BCV vorkommen (Lu, 1985). Dafür spricht, daß HEV in der Immunfluoreszenz besser mit BCV-Antikörpern reagierte, als HEV-Antikörper mit BCV (Pederson et al., 1978). Da jedoch auch bei der Infektion einer heterologen Spezies die Antikörpertiter in der Regel niedriger sind, als bei Infektion einer homologen Spezies, kann eine heterologe Infektion des Rindes mit HEV nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Ein klarer Hinweis dafür, daß die Antigenverwandtschaft zwischen HEV und BCV bei Anwendung des Neutralisationstestes nicht so eng ist, wie bisher beschrieben zeigen die Ergebnisse des Kreuzneutralisationstestes, in dem BCV kaum mit dem HEV-Immunserum reagierte. Dies würde mehr für eine Infektion von Rindern mit HEV sprechen.

Ähnlich müssen die Ergebnisse mit HEV beim Schaf und beim Pferd beurteilt werden. Beim Schaf ist bisher kein Coronavirus bekannt, das in einem Bericht beschriebene Coronavirus des Pferdes ist mit Viren der Gruppe 2 nicht verwandt (Huang et al., 1983).

Möglicherweise kommen einzelne Infektionen mit HEV auch bei den anderen Spezies vor, da die Ergebnisse, die im Neutralisationstest mit HEV erzielt wurden mit denen, die Lu (1985) für BCV beschreibt, nur teilweise korrelieren. Z.B. sind beim Hund, wo 54% aller Seren BCV-Antikörper aufweisen, in einem hohen Prozentsatz Titer von $\geq 1:640$ vorhanden, demgegenüber sind die HEV-Antikörpertiter eher

niedrig. Weiterhin kommen bei den Ziegenseren keine Antikörper gegen BCV vor, dagegen sind etwa 40% der Seren positiv gegen HEV. Umgekehrt ist es beim Menschen. In 93% aller menschlichen Seren kommen Antikörper gegen BCV vor, jedoch konnte in keinem der gleichen Seren Antikörper gegen HEV nachgewiesen werden.

Auch im Neutralisationstest mit MHV war ein hoher Prozentsatz von Rinderseren (64%) positiv, jedoch mit niedrigen Titern. Auch hier liegt eine Antigenverwandtschaft mit HEV sowie BCV und HCV OC-43 vor.

Eine Beurteilung der Ergebnisse muß notwendigerweise ähnlich denen mit HEV erzielten Daten sein, da einmal die Immunseren im Kreuzneutralisationstest nur mit niedrigen Titern mit HEV und BCV reagierten, zum anderen das Vorhandensein von Antikörpern gegen MHV in den Seren verschiedener Spezies nicht mit dem gegen HEV korrelierte. Z.B sind Ziegenseren zu 40% positiv bei Untersuchung mit HEV, dagegen sind ähnlich wie bei BCV (Lu, 1985) alle Seren negativ mit MHV. 10,5% der menschlichen Seren weisen Antikörper gegen MHV auf, jedoch keine gegen HEV. Diese Reaktion der Humansenen kann jedoch auch auf einer Antigenverwandtschaft beruhen, da MHV und das menschliche OC-43-Virus eine sehr enge Verwandtschaft besitzen (Kaye et al., 1977; Macnaughton, 1983; Hogue et al., 1984).

Insgesamt haben weniger Seren der verschiedenen Spezies Antikörper gegen MHV, wenn man die Werte mit HEV oder BCV (Lu, 1985) vergleicht. Auch die Titermittelwerte sind niedriger. Jedoch weist auch ein relativ hoher Prozentsatz von Pferdeseren Antikörper gegen MHV auf, ohne daß ein verwandtes Coronavirus beim Pferd bekannt wäre.

Klare Schlüsse hinsichtlich der einen oder anderen Möglichkeit können aus den vorliegenden Ergebnissen nicht gezogen werden. Bei vorsichtiger Interpretation können jedoch Infektionen heterologer Spezies mit HEV, hier besonders bei Rind, Schaf und Pferd, möglicherweise auch mit MHV, hier besonders bei Rind und Pferd nicht ausgeschlossen werden.

Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese
vage Vermutung zu bestätigen.

5. Zusammenfassung

1155 Seren von Rind, Schaf, Ziege, Pferd, Schwein, Hund, Kaninchen und vom Menschen wurden auf das Vorkommen von Antikörpern gegen das Hämagglutinierende Encephalomyelitis-Virus des Schweines (HEV) und gegen das Mäuse-Hepatitis-Virus (MHV) untersucht.

76,17% aller untersuchten Rinderseren wiesen Antikörper gegen HEV, 64,25% gegen MHV auf. Beim Schaf hatten 22,06% Antikörper gegen HEV, 1,47% gegen MHV. 39,58% der untersuchten Ziegensereren hatten Antikörper gegen HEV, jedoch keine gegen MHV. Von den Schweineseren waren 64,43% gegen HEV und 3,61% gegen MHV seropositiv. 8,7% der Pferdeseren waren gegen HEV und 10,87% gegen MHV positiv. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei den Hundeseren ermittelt. 9,18% hatten Antikörper gegen HEV, 4,08% gegen MHV. Von den Kaninchenseren waren 26,83% positiv gegen HEV und 4,88% gegen MHV. Die menschlichen Seren hatten nur Antikörper gegen MHV (10,47%).

Die Ergebnisse werden im Hinblick darauf diskutiert, ob das Vorkommen von Antikörpern bei heterologen Spezies als Infektion mit dem jeweiligen Erreger, als Reaktion gemeinsam vorkommender Antigene bei HEV und MHV mit dem bovinen Coronavirus und dem menschlichen Coronavirus OC-43, oder als Infektion der einzelnen Spezies mit einem homologen, bisher unbekannten Coronavirus bei den einzelnen Spezies anzusehen ist.

Summary

The Incidence of Antibodies Against Haemagglutinating Encephalomyelitis-Virus and Murine Hepatitis-Virus in Various Species

The incidence of antibodies against HEV (swine) and MHV was investigated in 1155 sera from cattle, sheep, goat, horse, swine, dog, rabbit and man.

Antibodies against HEV were found in 76,17% of the investigated bovine sera, against MHV in 64,25%. 22,06% of the investigated sheep sera had antibodies against HEV, 1,47% against MHV. In 39,58% of the investigated sera from goat antibodies were found against HEV, but no antibodies were found against MHV. From the sera of swine, 64,43% had antibodies against HEV and 3,61% against MHV. 8,7% of the equine sera were positive against HEV and 10,87% against MHV. A similar result was found for the canine sera: 9,18% had antibodies against HEV, 4,08% against MHV. From the rabbit sera 26,83% were positive against HEV and 4,88% against MHV. Human sera only had antibodies against MHV (10,47%).

The results were discussed with respect to whether

1. the incidence of antibodies in heterologous species is a result of an infection with the corresponding virus, or is
2. the incidence of antibodies a result of identical antigen structures of HEV, MHV, BCoV and HCV OC-43, or is
3. just an infection of the single species with a hitherto unidentified homologous coronavirus.

6. Literaturverzeichnis

- ALEXANDER, D.J., M.S. COLLINS, 1975: Effect of pH on the growth and cytopathogenicity of avian infectious bronchitis virus in chick kidney cells.
Arch. Virol. 49: 339-348.
- BERRY, D.M., K.J. STOKES, 1980: Antigenic variations in isolates of infectious bronchitis virus.
Vet. Res. 82: 157-160.
- BHATT, P.N., D.H. PERCY, A.M. JONAS, 1972: Characterization of virus of sialodacryoadenitis of rats: a member of coronavirus group.
J. infect. Dis. 126, 123-130
- BINGHAM, R.W., 1975: The polypeptide composition of avian infectious bronchitis virus.
Arch. Virol. 49: 207-216.
- BINGHAM, R.W., M.M. MADGE, D.A. TYRRELL, 1975: Haemagglutination by avian infectious bronchitis virus - a coronavirus.
J. gen. Virol. 28: 381-390.
- BINGHAM, R.W., J.D. ALMEIDA, 1977: Studies on the structure of a coronavirus-avian infectious bronchitis virus.
J. gen. Virol. 36: 495-502.
- BINN, L.M., E.C. LAZAR, K.P. KEENAN, D.L. HUXSOLL, R.H. MARCHWICKI, A.J. STRANO, 1974: Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhoea.
Proc. U.S. Animal Health Assoc. 78: 359-366.
- BOHAC, J., J.B. DERBYSHIRE, 1976: The detection of transmissible gastroenteritis viral antibodies by immunodiffusion.
Canad. J. comp. Med. 40: 161-165.
- BOND, C.W., J.L. LEIBOWITZ, J.A. ROBB, 1979: Pathogenic murine coronaviruses. II. Characterization of virus-specific proteins of murine coronavirus JHMV and A59V.
Virology 94: 371-384.
- BOND, C.W., K. ANDERSON, S. CROSS, L. SARDINIA, 1981: Relatedness of virion and intracellular proteins of the murine coronavirus JHM and A-59.
In: V. ter Meulen, S. Siddell, H. Wege (eds:), Biochemistry and Biology of Coronaviruses, Plenum Press, New York, 103-110.

- BRADBURN, A.F., 1970: Antigenic relationships amongst coronaviruses.
Arch. ges. Virusforsch. 31: 352-364.
- BRIAN, D.A., D.E. DENNIS, J.S.GUY, 1980: Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus.
J. Virol. 34: 410-415.
- BRIDGER; J.C., E.O. CAUL, S.I. EGGLESTONE, 1978: Replication of an enteric bovine coronavirus in intestinal organ culture.
Arch. Virol. 37: 43-51.
- CALLEBAUT, P.E., M.B. PENSAERT, 1980: Characterization and isolation of structural polypeptides in haemagglutinating encephalomyelitis virus.
J. gen. Virol. 48: 193-204.
- CARTWRIGHT, S.F., M. LUCAS, 1970: Vomiting and wasting disease in piglets.
Vet. Rec. 86: 278-280.
- CAUL, E.O., S.I. EGGLESTONE, 1977: Further studies on human enteritic coronaviruses.
Arch. Virol. 54: 107-117.
- CAUL, E.O., C.R. ASHLEY, M. FERGUSON, S.J. EGGLESTONE, 1979: Preliminary studies on the isolation of coronavirus 229 E nucleocapsids.
FEMS Microbiology Letters 5: 101-105.
- CAVANAGH, D., 1981: Structural polypeptides of coronavirus IBV.
J. gen. Virol. 53: 93-103.
- CLEWLEY, J.P., J. MORSER, J.R. AVERY, B. LOMNICZI, 1981: Oligonucleotide fingerprinting of the RNA of different strains of infectious bronchitis virus.
Infect. Immun. 32: 1227-1233.
- COLLINS, M.S., D.J. ALEXANDER, J.W. HARKNESS, 1976: Heterogeneity of infectious bronchitis virus genome in eggs.
Arch. Virol. 50: 55-72.
- COLLINS, M.S., D.J. ALEXANDER; 1980a: Avian infectious bronchitis virus structural polypeptides. Effect of different conditions of disruption and comparison of different strains and isolates.
Arch. Virol. 63: 239-251.

- COLLINS, M.S., D.J. ALEXANDER, 1980b: The polypeptide composition of isolated surface projections of avian infectious bronchitis virus.
J. gen. Virol. 48: 213-217.
- COWEN, B.S., S.B. HITCHNER, 1975: Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test.
Avian Dis. 19: 583-595.
- DARBYSHIRE, J.H., J.G. ROWELL, J.K.A. COOK, R.W. PETERS, 1979: Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus, using neutralization tests in tracheal organ cultures.
Arch. Virol. 61: 227-238.
- DAVIES, H., M.R. MACNAUGHTON, 1979: Comparison of the morphology of three coronaviruses.
Arch. Virol. 59: 25-33.
- DAVIES, H., R.R. DOURMASHKIN, M.R. MACNAUGHTON; 1981: Ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis virus.
J. gen. Virol. 53: 67-74.
- DEA, S., B.S. ROY, M.E. BEGIN, 1980: Bovine coronavirus isolation and cultivation in continuous cell lines.
Am. J. vet. Res. 41: 30-38.
- EARLE, W.R., 1934: A technique for adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions and hydrogen ion concentration in tissue cultures planted in Carrel flacs.
Arch. exp. Zellforsch. 16: 116.
- GARWES, D.J., D.H. POCKOCK, 1975: The polypeptide structure of transmissible gastroenteritis virus.
J. gen. Virol. 29: 25-34.
- GARWES, D.J., D.H. POCKOCK, B.V. PIKE, 1976: Isolation of subviral components from transmissible gastroenteritis virus.
J. gen. Virol. 32: 283-294.

- GARWES, D.J., M.M. LUCAS, D.A. HIGGINS, B.V. PIKE, S.F. CARTWRIGHT, 1978/79: Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus.
Vet. Microbiol. 3: 179-190.
- GARWES, D.J., D.J. REYNOLDS, 1981: The structure of canine coronavirus and its relationship to porcine transmissible gastroenteritis virus.
J. Gen. Virol. 52: 153-157.
- GERNA, G., P.M. CEREDA, M.G. REVELLO, E. CATTANEO, M. BATTAGLIA, M. TORSELLINI-GERNA, 1981: Antigenic and biological relationships between human coronavirus OC-43 and neonatal calf diarrhoea coronavirus.
J. gen. Virol. 54: 91-102.
- GERNA, G., M. BATTAGLIA, P.M. CEREDA, N. PASSARANI, 1982: Reactivity of human coronavirus OC-43 and neonatal calf diarrhoea coronavirus membrane-associated antigens.
J. gen. Virol. 60: 385-390.
- GIRARD, A., A.S. CREIG, D. MITCHELL, 1964: Encephalomyelitis of swine caused by a haemagglutinating virus. III.-Serological studies.
Res. vet. Sci., 5.
- GREIG, A.S., C.M. JOHNSON; A.M.P. BOUILLANT, 1971: Encephalitis of swine caused by a haemagglutinating virus. VI. Morphology of the virus.
Res. vet. Sci. 12: 305-307.
- GUY, J.S., D.A. BRIAN, 1979: Bovine coronavirus genome.
J. Virol. 29: 293-300.
- HAJER, J., J. STORZ, 1978: Antigens of bovine coronavirus strain LY-138 and their diagnostic properties.
Am. J. Vet. Res. 39: 441-444.
- HARTLEY, J.W., W.P. ROWE, H.H. BLOOM, H.C. TURNER, 1964: Antibodies to mouse hepatitis viruses in human sera. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 115: 414-418.
- HESS, R.G., P.A. BACHMANN, 1978: Erbrechen und Kümern der Ferkel: Vorkommen und Verbreitung in Süddeutschland Tierärztl. Umschau. 33: 571-574

- HESS, R.G., W. BOLLWAHN, S. POSPISCHIL, K. HEINRITZI, P.A. BACHMANN, 1980: Neue Aspekte der Virusätiologie bei Durchfallerkrankungen des Schweines: Vorkommen von Infektionen mit dem Epizootischen Virusdiarrhoe (EVD)-Virus.
Berl. Münchn. tierärztl. Wschr. 93, 445
- HIERHOLZER, J.C., E.L. PALMER; S.G. WHITFIELD, H.S. KAYE, W.R. DOWDLE, 1972: Protein composition of coronavirus OC-43.
Virology 48: 516-527.
- HIERHOLZER, J.C., 1976: Purification and biophysical properties of human coronavirus 229E.
Virology 75: 155-165.
- HIERHOLZER, J.C., M.C. KEMP, G.A. TANNOCK, 1981: The RNA and proteins of human coronaviruses.
In: ter Meulen V., Siddell, S., Wege, H., (eds) Biochemistry and Biology of Coronaviruses, Plenum Press, New York 43-68.
- HIRAI, K., C-N, CHANG, S. SHIMAKURA, 1974: A serological survey on haemagglutinating encephalomyelitis virus infection in pigs in Japan.
Jap. J. vet. Sci. 36: 375-380.
- HIRANO, N., K. FUJIWARA, S. HINO, M. MATUMOTO, 1974: Replication and plaque formation of mouse hepatitis virus (MHV-2) in mouse cell line DBT culture.
Arch. ges. Virusforsch. 44: 298-302
- HOGUE, B.G., B. KING, D.A. BRIAN, 1984: Antigenic relationship among proteins of bovine coronavirus, human respiratory coronavirus OC-43, and mouse hepatitis coronavirus A-59.
J. Virol. 51: 384-388.
- HOLMES, U.V., E.W. DOLLAR, J.N. BEHNKE, 1981: Analysis of the functions of coronaviruses glycoproteins by differential inhibition of synthesis with tunicamycin.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds) Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum Press, New York, 133-142.

- HORZINEK, M.C., H. LUTZ, N.C. PEDERSON, 1982: Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline and canine coronaviruses. Infekt. Immun. 37: 1148-1155.
- HOVI, T., 1978: Nonspecific inhibitors of coronavirus OC-43 haemagglutination in human sera. Med. Microbiol. Immunol. 166: 173-176.
- HOVI, T., H. KAINULAINEN, B. ZIOLA, A. SALMI, 1979: OC-43 strain-related coronavirus antibodies in different age groups. J. Med. Virol. 3: 313-320.
- HUANG, J.C., S.L. WRIGHT, W.D. SHIPLEY, 1983: Isolation of coronavirus-like agent from horses suffering from acute equine diarrhoea syndrome. Vet. Rec. 113: 262-263.
- KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 162, 480.
- KAPIKIAN, A.Z., H.D. JAMES, S.J. KELLY, L.M. KLING, A.L. VANAUGH, R.M. CHANOCK, 1972: Haemadsorption by coronavirus strain OC-43. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 139: 179-186.
- KAYE, H.S., J.C. HIERHOLZER, W.R. DOWDLE, 1970: Purification and further characterization of an "IBV-like" virus (coronavirus). Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 135: 457-463.
- KAYE, H.S., H. B. MARSH, W.R. DOWDLE, 1971: Seroepidemiologic survey of coronavirus (strain OC-43) related infectious in a children's population. Amer. J. Epidemiol. 94: 43-49.
- KAYE, H.S., W.B. YARBROUGH, C.J. REED, A.K. HARRISON, 1977: Antigenic relationship between human coronavirus strain OC-43 and haemagglutinating encephalomyelitis virus strain 67N of swine: antibody responses in human and animal sera. J. inf. Dis. 135: 201-209.

- KENNEDY, D.A., C.M. JOHNSON-LUSSENBURG, 1975/1976: Isolation and morphology of the internal component of human coronavirus strain 229E.
Intervirology 6: 197-206.
- KLENK, H.D., R. ROTT, 1980: Cotranslational and post-translational processing of viral glycoproteins.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 90: 19-48.
- KRAAIJEVELD, C.A., S.E. REED, M.R. MACNAUGHTON, 1980: Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibody in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group virus.
J. clin. Microbiol. 12: 493-497.
- KUMANISHI, T., 1967: Brain tumors induced with rees sarcoma virus, Schmidt-Ruppin strain. 1. Indction of brain tumors in adult mice with rous chicken sarcoma cells. Japan, J. Exp. Med. 37: 461-474
- LAI, M.M.C., S.A. STOHLMAN, 1978: The RNA of mouse hepatitis virus.
J. Virol. 26: 236-242.
- LAI, M.M.C., P.R. BRAYTON, R.C. ARMEN, C.D. PATTON, S.A. STOHLMAN, 1981: Mouse hepatitis virus A59 messenger RNA structure and genetic localisation of the sequence divergence from the hepatropic strain MHV3.
J. Virol. 39: 823-834.
- LAI, M.M.C., S.A. STOHLMAN, 1981a: Comparative analysis of RNA genome of mouse hepatitis viruses.
J. Virol. 38: 661-670.
- LAI, M.M.C., S.A. STOHLMAN, 1981b: Genome structure of mouse hepatitis virus. Comparative analysis by oligo-nucleotid mapping.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (Eds) Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum Press, New York, 69-82.
- LANSER, J.A., C.R. HOWARD, 1980a: The polypeptides of infectious bronchitis virus (IBV-41 strain).
J. gen. Virol. 46: 349-361.
- LANSER, J. ., C.R. HOWARD, 1980b: The disruption of infectious bronchitis virus (IBV-41 strain) with Triton X-100 detergent.
J. virol. Meth. 1: 121-131.

- LAPORTE, J., P. BOBULESCO, 1981: Polypeptide structure of bovine enteric coronavirus. Comparison between a wild strain purified from feces and a HRT-18 cell adapted strain.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds) Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum Press, New York, 181-184.
- LEIBOWITZ, J.L., K.C. WILHELMSON, C.W. BOND, 1981: The virus-specific intracellular RNA species of two murine coronaviruses: MHV-A59 and MHV-JHM.
Virology 114: 39-51.
- LEIBOWITZ, J.L., S.R. WEISS, 1981: Murine coronavirus RNA.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds) Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum Press, New York, 227-244.
- LIEBERMANN, H., W. VETTERLEIN, 1970: Beobachtungen bei virologischen Arbeiten mit Schweineschilddrüsenzellkulturen.
Arch. exp. Vet. Med. 24: 559.
- LOMNICZI, B., F. KENNEDY, 1977: Genome of infectious bronchitis virus.
J. Virol. 24: 99-107.
- LOMNICZI, B., 1977: Biological properties of avian coronavirus RNA.
J. gen. Virol. 36: 531-533.
- LOMNICZI, B., J. MOSER, 1981: Polypeptides of infectious bronchitis virus, I. Polypeptides of the virion.
J. gen. Virol. 55: 155-164.
- LU., C., 1985: Isolierung, Charakterisierung und Epidemiologie boviner Coronaviren.
Med. vet. Diss., München.
- MACNAUGHTON, M.R., H. MADGE, 1977: The polypeptide composition of avian infectious bronchitis virus particles.
Arch. Virol. 55: 47-54.
- MACNAUGHTON, M.R., M.H. MADGE, H.A. DAVIES, R.R. DOUR-MASHKIN, 1977: Polypeptides of the surface projections and the ribonucleoprotein of avian infectious bronchitis.
J. Virol. 24: 821-825.

- MACNAUGHTON, M.R., M.H. MADGE, 1978: The genome of human coronavirus strain 229E.
J. gen. Virol. 39: 497-504.
- MACNAUGHTON, M.R., H.A. DAVIES, M.V. NERMUT, 1978: Ribonucleoprotein-like structures from coronavirus particles.
J. gen. Virol. 39: 545-549.
- MACNAUGHTON, M.R., 1978: The genomes of three coronaviruses.
FEBS Letters 94: 191-194.
- MACNAUGHTON, M.R., H.A. DAVIES, 1980: Two particle types of avian infectious bronchitis virus.
J. gen. Virol. 47: 365-372.
- MACNAUGHTON, M.R., 1980: The polypeptides of human and mouse coronaviruses.
Arch. Virol. 63: 75-80.
- MACNAUGHTON, M.R., 1981: Structural and antigenic relationships between human, murine and avian coronaviruses.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds), The Biology and Biochemistry of Coronaviruses. Plenum Press, New York, 19-28.
- MACNAUGHTON, M.R., M.H. MADGE, S.E. REED, 1981: Two antigenic groups of human coronaviruses detected by using enzyme-linked immunosorbent assay.
Infect. Immun. 33: 734-737.
- MAHY, B.W.J., 1981: Biochemistry of Coronaviruses 1980.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds), Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum Press, New York. 261-270.
- McINTOSH, K., A.Z. KAPIKAN, K.A. HARDISON, J.W. HARTLEY, R.M. CHANOCK, 1969: Antigenic relationship among the coronaviruses of man and between human and animal coronaviruses.
J. Immunol. 102: 1109-1118.
- McINTOSH, K., 1974: Coronaviruses. A comparative review.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 63: 85-129.

- McINTOSH, K., R.K. CHAO, H.E. KRAUSE; R. WASIL, H.E. MOCEGA,
M.A. MUFSON, 1974: Coronavirus infection in acute lower
respiratory tract disease of infants.
I. infect. Dis. 130: 502-507.
- MENGELING, W.L., 1972: Encephalomyelitis- vomiting
and wasting disease complex of swine.
Proc. Ann. Meet., US Animal Hlth Assoc. 75:
485-491.
- MENGELING, W.L., 1975: Incidence of antibody for
haemagglutinating encephalomyelitis virus in
serum from swine in the United States.
Am J. vet. Res. 36: 821-823.
- MONTO, A.S., L.M. RHODES, 1977: Detection of corona-
virus infection of man by immunfluorescence.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155: 143-148.
- NAGY, E., B. LOMNICZI, 1979: Polypeptide patters of
infectious bronchitis virus serotypes fall in
two categories.
Arch. Virol. 61: 341
- NIEMANN, H., H.D. KLENK, 1981: Glycoprotein E1 of
coronavirus A59. A new type of viral glyco-
protein.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds)
Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum
Press, New York, 119-132.
- OBERT, G., E. GROLLEMUND, H. NONNENMACHER. A. KIRN,
1981: Analysis and localisation of mouse
hepatitis virus 3 (MHV-3) polypeptides.
Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 132E: 109-114.
- OSTERHAUS, A.D.M.E., M.C. HORZINEK, D.J. REYNOLDS,
1977: Seroepidemiology of feline infectious
peritonitis virus infections using transmissible
gastroenteritis virus as antigen.
Zbl. Vet. Med. B 24: 835-841.
- PARKER, J.C., S.S. CROSS, W.P. ROWE, 1970: Rat corona-
virus (RCV): a prevalent, naturally occurring pneu-
motropic virus of rats.
Arch. Ges. Virusforsch. 31: 293-302.

- PEDERSON, N.C., J. WARD, W.L. MENGELING, 1978: Antigenic relationship of the feline infectious peritonitis virus to coronavirus of other species.
Arch. Virol. 58: 45-53.
- PENSAERT, M., P. CALLEBAUT, 1978: The coronaviruses. Clinical and structural aspects with some practical implications.
Ann. Méd. Vét. 122: 301-322.
- PENSAERT, M.B., P. DEBOUCK, 1978: A new coronavirus-like particle associated with diarrhoea in swine.
Arch. Virol. 58: 243-247.
- PENSAERT, M.B., P. DEBOUCK; D.J. REYNOLDS, 1981: An immun-electron microscopy and immunfluorescent study on the antigenic relationship between the coronavirus-like agent CV-777 and serval coronaviruses.
Arch. Virol. 68: 45-52.
- PHILLIP, J.I.M., S.F. CARTWRIGHT, A.C. SCOTT, 1971: The size and morphology of transmissible gastroenteritis and vomiting and wasting disease viruses in pigs.
Vet. Rec. 88: 311-312.
- PIKE, B.V., D.J. GARWES, 1977: Lipids of transmissible gastroenteritis virus and their relation to those of two different host cells.
J. gen. Virol. 34: 531-535.
- POCOCK, D.H., D.J. GARWES, 1975: The influence of pH on the growth and stability of transmissible gastro-enteritis virus.
Arch. Virol. 49: 239-247.
- POCOCK, D.H., D.J. GARWES, 1977: The polypeptides of haemagglutinating encephalomyelitis virus and isolated subviral particles.
J. gen. Virol. 37: 487-499.
- POCOCK, D.H., 1978: Effect of sulphhydryl reagents on the biological activities, polypeptide composition, and morphology of haemagglutinating encephalomyelitis virus.
J. gen. Virol. 40: 93-101.

- POMEROY, B.S., C.T. LARSEN, B.L. PATEL, 1975: Immunity to transmissible (coronaviral) enteritis of turkey (bleucomb).
Am. J. Vet. Res. 36: 553-555.
- REYNOLDS, D.J., D.J. GARWES, C.J. GASKELL, 1977: Detection of transmissible gastroenteritis virus neutralizing antibody in cats.
Arch. Virol. 55: 77-86
- REYNOLDS, D.J., D.J. GARWES, S. LUCEY, 1980: Differentiation of canine coronavirus and porcine transmissible gastroenteritis virus by neutralization with canine, porcine and feline sera.
Vet. Microbiol. 5: 287-290.
- RITCHIE, A.E., D.R. DESHMUKH, C.T. LARSEN, B.S. POMEROY, 1973: Electron microscopy of coronavirus-like particles characterization of turkey bleucomb disease.
Avian Dis. 17: 546-558.
- ROBB, J.A., C.W. BOND, 1979: Coronaviridae
In: Fraenkel-Conrat H., Wagner, R.R. (eds) Comprehensive virology vol. 14. Plenum Press New York, 193-247.
- ROTTIER, P.J.M., W.J.M. SPAAN, M. HORZINEK, B.A.M. van der ZEIJST, 1981a: Translation of three mouse hepatitis virus (MHV-A 59) subgenomic RNAs in *Xenopus laevis* oocytes.
J. Virol. 38: 20-26.
- ROTTIER, P.J.M., M.C. HORZINEK, B.A.M. van der ZEIJST, 1981b: Viral protein synthesis in mouse hepatitis virus strain A59-infected cells: effect of tunicamycin.
J. Virol. 40: 350-357.
- SARATEANU, D.E., W. EHRENGUT, 1975: Serological study of coronavirus-antibodies in Hamburg.
Immunität und Infektion 3: 86-88.
- SATO, K., Y. INABA, M. MATUMOTO, 1980: Serological relation between calf diarrhoea coronavirus and haemagglutinating encephalomyelitis virus.
Arch. Virol. 66: 157-159.

- SATO, K., Y. INABA, Y. MIURA, S. TOKUHISA, H. AKASKI, T. SHINOZAKI, M. MATUMOTO, 1981: Neutralizing antibody to calf diarrhoea coronavirus in various animal species in Japan.
Microbiol. Immunol. 25: 623-625.
- SCHMIDT, O.W., G.E. KENNY, 1981: Immunogenicity and antigenicity of human coronavirus 229E and OC-43.
Infect Immun. 32: 1000-1006.
- SCHMIDT, O.W., G.E. KENNY, 1982: Polypeptides and functions of antigens from human coronaviruses 229E and OC-43.
Infect. Immun. 35: 515-522.
- SCHMIDT, O.W., 1984: Antigenic characterization of human coronaviruses 229E and OC43 by enzyme-linked immunosorbent assay.
J. clin. Mikrobiol. Vol. 20, No. 2, 175-180.
- SCHOCKETMAN, G., R.H. STEVENS, R.W. SIMPSON, 1977: presence of infectious polyadenylated RNA in the coronavirus avian infectious bronchitis virus.
Virology 77: 772-782. ,
- SHARPEE, R., C.A. MEBUS, 1975: Letter to the editor.
Lancet I 639.
- SHARPEE, R.L., 1976: Characterization of a calf diarrheal coronavirus.
PhD Dissertation, University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, Oktober 1976.
- SIDDELL, S.G., A. BARTHEL, V. ter MEULEN, 1981 : Coronavirus JHM. A virion-associated protein kinase.
J. Gen. Virol. 52: 235-243.
- SIDDELL, S., H. WEGE, V. ter. MEULEN, 1982: The structure and replication of coronaviruses.
Curr. Top. Microbiol. Immun. 99: 131-163.
- SPAAN, W.J. P.J.M. ROTTIER, M.C. HORZINEK, B.A.M. van der ZEIJST, 1981: Isolation and identification of virus-specific m-RNA in cells infected with mouse hepatitis virus (MHV-A59).
Virology 108: 424-434.
- SPAERMAN, C., 1908: Lit. nach Kärber.
Brit. J. Psychol. 2: 227.

- STAIR, E.L., M.B. RHODES, R.G. WHITE, C.A. MEBUS, 1972:
Neonatal calf diarrhea. Purification and electron
microscopy of a coronavirus-like agent.
Am. J. vet. Res. 33: 1147-1156.
- STERN, D.F., S.I.T. KENNEDY, 1980: Coronavirus multi-
plication strategy. I. Identification and character-
ization of corona-spezifised RNA.
J. Virol. 34: 665-674.
- STERN, D., L. BURGESS; S. LINESCH, I. KENNEDY, 1981:
The avian coronavirus multiplication strategy.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds)
Biochemistry and Biology of Coronavirus. Plenum
Press, New York, 185-192.
- STOHLMAN, S.A., M.M.C. LAI, 1979: Phosphoproteins of
murine hepatitis viruses.
J. gen. Virol. 32: 672-675.
- STORZ, J., R. ROTT, 1981: Reactivity of antibodies in
human serum with antigens of an enteropathogenic
bovine coronavirus.
MMI 169: 169-178.
- STORZ, J., G. KALUZA, H. NIEMAND, R. ROTT, 1981a: An
enteropathogenic bovine coronavirus.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds)
Biochemistry and Biology of coronaviruses. Plenum
Press, New York, 171-180.
- STORZ, J., R. ROTT, G. KALUZA, 1981b: Enhancement of
plaque formation and cell fusion of an entero-
pathogenic coronavirus by trypsin treatment.
Infect. Immun. 31: 1214-1222.
- STURMAN, L.S., 1977: Characterization of a coronavirus.
I. Structural proteins: effects of preparative
conditions on the migration of protein in poly-
acrylamid gels.
Virology 77: 637-649.
- STURMAN, L.S., C.V. HOLMES, 1977: Characterization of a
coronavirus. II. Glycoprotein of the viral envelope
tryptic peptide analysis.
Virology 77: 650-660.

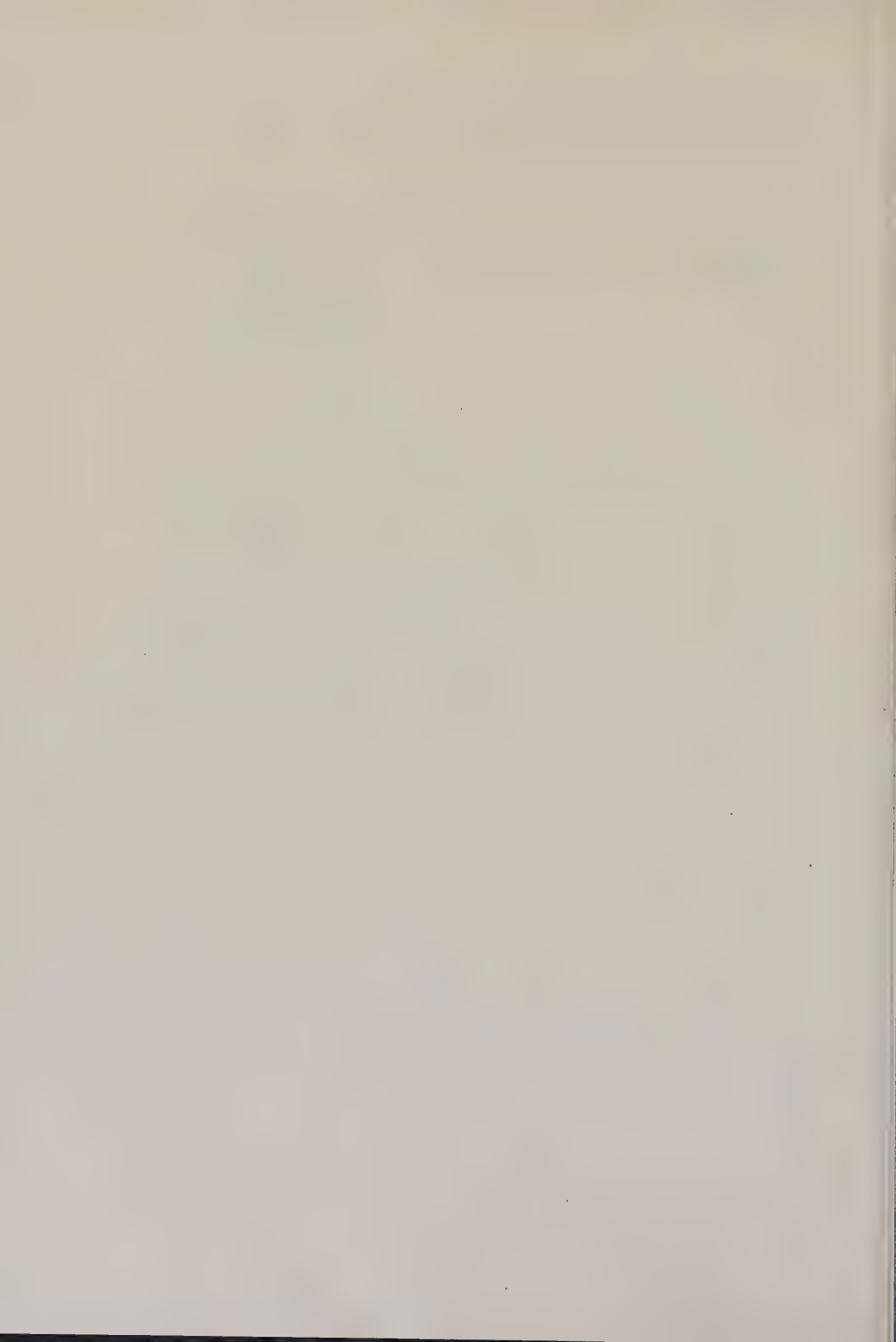
- STURMAN, L.S., K.V. HOLMES, J. BEHNKE, 1980: Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid.
J. Virol. 33: 449-462.
- STURMAN, L.S., 1981: The structure and behaviour of coronavirus A 59 glycoprotein: In: ter Meulen V, Siddell S., Wege H. (eds) Biochemistry and Biology of Coronaviruses. Plenum Press, New York, 1-18.
- SUGIYAMA, K., Y. AMANO, 1980: Haemagglutination and structural polypeptides of a new coronavirus associated with diarrhoea in infant mice.
Arch. Virol. 66: 95-105.
- SUGIYAMA, K., Y. AMANO; 1981: Morphology and biological properties of a new coronavirus associated with diarrhoea in infant mice.
Arch. Virol. 67: 241-251.
- TYRRELL, D.A.J., D.J. ALEXANDER, J.D. ALMEIDA, C.H. CUNNINGHAM, B.C. EASTERDAY, D.J. GARWES, J.C. HIERHOLZER, A. KAPIKIAN, M.R. MACNAUGHTON, K. McINTOSH, 1978: Coronaviridae 2nd report.
Intervirology 10: 321-328.
- VOGEL, J., A. SHELOKOV, 1957: Adsorption-haemagglutination test for influenza virus in monkey kidney tissue culture.
Science 126: 358.
- WADAY, C.N., J.F. FARAGHER, 1981: Australian infectious bronchitis viruses: identification of nine subtypes by a neutralization test.
Res. Vet. Sci. 30, 70-74.
- WADAY, C.N., E.G. WESTAWAY, 1981: Structural proteins and glycoproteins of infectious bronchitis virus particles labelled during growth in chick embryo fibroblasts.
Intervirology 15: 19-27.
- WALKER, D.P., G.M. CLEATER, 1980: Haemagglutination by mouse hepatitis virus type 3.
Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 131E: 517-520.
- WEGE, M., A. MÜLLER, V. ter MEULEN, 1978: Genomic RNA of the murine coronavirus JHM.
J. gen. Virol. 41: 217-227.

- WEGE, H., H. WEGE, K. NAGASHIMA; V. ter MEULEN, 1979:
Structural polypeptides of the murine coronavirus
JHM.
J. gen. Virol. 42: 37-47.
- WEGE, H., J.R. STEPHENSON, M. KOGA, H. WEGE, V. ter MEULEN,
1981a: Genetic variation of neurotropic and non-neuro-
tropic murine coronaviruses.
J. gen. Virol. 54: 67-74.
- WEGE, H., S. SIDDELL, M. STURM, V. ter MEULEN, 1981b:
Coronavirus JHM: characterization of intracellular
viral RNA.
J. gen. Virol. 54: 213-217.
- WEGE, H., S. SIDDELL, V. ter MEULEN, 1982: The bio-
logy and pathogenesis of coronaviruses.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 99: 165-200.
- WEISS, S.R., J.L. LEIBOWITZ, 1981: Comparison of the
RNAs of murine and human coronaviruses.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds)
Biochemistry and Biologie of Coronaviruses. Plenum
Press, New York, 245-260.
- WITTE, K.H., K. TUCH, H. DUBENKROPP, C. WALTHER, 1977:
Untersuchungen über die Antigenverwandtschaft der
Viren der feline infektiösen Peritonitis und der
transmissiblen Gastroenteritis des Schweines.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 90: 396-401.
- WITTE, K.H., D. PRAGER, H. ERNST, H. NIENHOFF, 1981:
Epizootische Virusdiarrhoe.
Tierärztl. Umsch. 36, 235.
- WOODS, R.D., N.C. PEDERSON, 1979: Cross-protection studies
between feline infectious peritonitis and porcine
transmissible gastroenteritis viruses.
Vet. Microbiol. 4: 11-16.
- YOGO, Y., N. HIRANO, S. HINO, H. SHIBUTA, M. MATUMOTO, 1977:
Polyadenylate in the virion RNA of mouse hepatitis
virus.
J. Biochem. (Tokyo) 82: 1103-1108

ZEIJST, van der, B.A.M., C.M. HORZINEK, L. JACOBS, P.J.M.
ROTTIER, W.L.M. SPAAN, 1981: Messenger RNAs of mouse
hepatitis virus A59: Isolation and characterization,
translation in *Xenopus laevis* oocytes of RNAs 3, 6
and 7 UV target sizes of transcription templates.
In: ter Meulen, V., Siddell, S., Wege, H., (eds)
Biochemistry and Biology of Coronaviruses, Plenum
Press, New York, 209-226.

LEBENS LAUF

Name		<u>Rainer</u> Alfred Zink
geboren am	17.09.1956	in Memmingen
Eltern		Alfred Zink, Angestellter Christa Zink, geb. Scholtyssek
Schul Ausbildung	1962-1970	Grund- und Hauptschule Benningen
	1970-1974	Staatliche Wirtschafts- schule Memmingen
	1974-1977	Wirtschaftsgymnasium Ravensburg
Studium	1977-1982	Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München
	11.11.1982	Approbation als Tierarzt
	1.01.1983	Beginn der vorliegenden Doktorarbeit



Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. P.A. Bachmann gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und seine stete Unterstützung.

Bei Herrn Dr. R.G. Hess und Herrn Dr. W. Eichhorn bedanke ich mich für die anregende wissenschaftliche Zusammenarbeit und ihre freundliche Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Isolierabteilung für ihre Hilfsbereitschaft.

